



Montpellier

THESE DE MASTER OF SCIENCE
En génie agroalimentaire méditerranéen et tropical

**ETUDE DU MODE D'ACTION DE QUELQUES TRAITEMENTS SUR
LE MAITIEN DE LA COLORATION ROUGE DU PERICARPE DE
LITCHI**

Par
Hasina RAMARSON

Soutenue le 12 JUILLET 2004 devant le jury

Président	Mr A. LARWENCE (Pr ENSIA-SIARC)
Rapporteur	Mr C. DIDIER (IR CIRAD-FLHOR)
Examineur	Mme M-N.DUCAMP (IR CIRAD-FLHOR)
Examineur	Mme M.FIGUEROA (MC ENSIA-SIARC)
Examineur	Mr M. DORNIER (MC ENSIA-SIARC)

Travail réalisé au CIRAD-FLHOR (Montpellier)



Etude du mode d'action du traitement acide sur le maintien de la coloration rouge du litchi



Hasina Ramarson*, Marie-Noëlle Ducamp-Collin**
Marc Lebrun**

* Ensis-Silac, 1101 av. Agropolis, 34093 Montpellier, France
** Cirad, département des productions fruitières
et horticoles, TA 50/PS4, Bd de la Lironde
34398 Montpellier Cedex 5, France

Le litchi est un fruit subtropical et tropical qui a une très haute valeur commerciale sur le marché international. Après récolte, le fruit est très périssable et perd rapidement la couleur rouge de son péricarpe, en brunissant après 1 ou 2 jours à température ambiante. Le brunissement constitue un obstacle majeur à la commercialisation du litchi, bien qu'il n'ait aucun effet sur la qualité organoleptique de l'arille. Plusieurs auteurs tendent à attribuer le brunissement de la coque de litchi à des activités enzymatiques oxydantes. L'altération des compartiments cellulaires (par sénescence, dessiccation...) conduirait à une dégradation rapide des pigments rouges (anthocyanes) par la PPO et la POD, qui aboutit à des sous-produits bruns. Pour contrôler le brunissement du litchi, le Cirad travaille actuellement sur l'association du traitement acide avec ajout d'une molécule active comme traitement alternatif au soufrage des litchis transportés par bateau. L'objectif de ce travail est d'étudier les modes d'action de ce traitement sur le maintien de la coloration rouge du litchi, en relation avec les activités enzymatiques, et cela sur deux variétés.

Matériel et méthodes

Les fruits étudiés sont issus de deux variétés qui approvisionnent le marché européen : Kwaï May (Réunion) et Wai Chee (Espagne). Les traitements de trempage consistent à immerger les fruits dans une solution aqueuse d'acide citrique (600 g/l) et du chitosane de poids moléculaire moyen (0,75 %).

Le dosage des activités enzymatiques est réalisé par spectrophotométrie. L'extraction de 10 g de coque congelée broyée est effectuée à 4 °C dans 50 ml de tampon phosphate (pH 6,8), auquel 3 g de PVPP sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé avec un Ultra turrax et centrifugé à 7 000 g pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est passé à travers un filtre millipore (0,45 µm) et constitue l'extrait enzymatique. L'activité PPO est mesurée par l'oxydation du catéchol (0,1 M), fraîchement dissous, comme substrat. L'absorbance à 400 nm du mélange réactionnel est suivie pendant 3 min à 25 °C. L'activité PPO est exprimée en $DDO_{400nm}/min/g$ de MS. L'activité POD est mesurée par l'oxydation du galacol (9 mM) en présence de H_2O_2 (10 mM). L'absorbance est enregistrée à 470 nm pendant 3 min à 25 °C. L'activité POD est exprimée en $DDO_{470nm}/min/g$ de MS. Les anthocyanes sont dosés par la méthode HPLC.

Résultats

La variété Wai Chee est plus riche en anthocyanes, surtout en rutinoside de cyanidol (figure 1). Les activités enzymatiques (PPO, POD) sont plus élevées chez la variété Kwaï May. Dans les deux variétés, l'activité POD est plus forte que l'activité PPO (figure 2). L'effet du traitement acide dépend des variétés (figures 3 et 4). Pour la variété Kwaï Mee, le traitement n'a pas d'effet significatif sur les activités enzymatiques et limite la dégradation des anthocyanes. Ce qui supposerait que la dégradation des anthocyanes n'est pas seulement enzymatique pour cette variété. Pour la variété Wai Chee, le traitement acide stimule les activités enzymatiques. Les pertes en anthocyanes coïncideraient bien avec l'augmentation des activités enzymatiques.



Figure 1. Comparaison du contenu anthocyanique des coques de deux variétés de litchi.

Références

Zhang Z, Xuequn P, Ji Z, Jiang Y. 2001. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chemistry* 75: 217-221.
Zhang Z, Xuequn P, Yang C, Ji Z, Jiang Y. 2004. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp. *Food Chemistry* 84: 601-604.

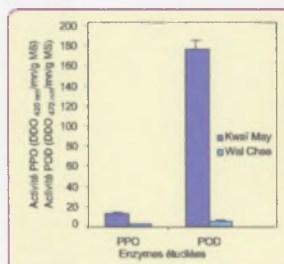


Figure 2. Comparaison des activités enzymatiques dans le péricarpe de deux variétés de litchi.

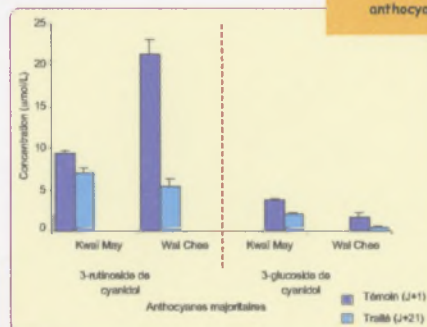
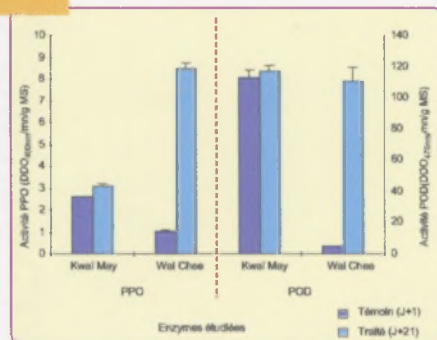


Figure 3. Effet du traitement acide sur le contenu anthocyanique.

Figure 4. Effet du traitement acide sur les activités enzymatiques.



Conclusion

En accord avec Zhang et al. (2001) et Zhang et al. (2004), le brunissement ne serait pas uniquement lié à des activités enzymatiques



Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
Département des productions fruitières et horticoles

REMERCIEMENTS

La travail présenté ici a été réalisé au sein du CIRAD-FLHOR de Montpellier. Il a été mené à terme, grâce à la contribution de nombreuses personnes que je tiens à remercier en particulier.

En premier lieu, j'adresse mes remerciements à Monsieur Max REYNES, directeur du laboratoire chimie - technologie du CIRAD-FLHOR, d'avoir bien voulu m'accueillir au sein de la structure dont il a la responsabilité .

J'exprime mes plus chaleureux remerciements à Madame Marie-Noëlle DUCAMP, Ingénieur de Recherche au CIRAD-FLHOR, qui a encadré ce travail de recherche. Sa compétence, son expérience et ses qualités humaines ont largement contribué à la réalisation de ce stage.

Je tiens à remercier Monsieur Manuel DORNIER, Maître de conférence à l'ENSIA-SIARC et chercheur associé au CIRAD-FLHOR, pour ses précieux conseils en tant qu'enseignant tuteur.

Un grand merci à Monsieur Aristide LARWENCE, responsable de la filière Master à l'ENSIA SIARC, mon « papa » à la SIARC. Son soutien et ses encouragements m'ont été d'un grand recours tout au long de mes études.

Je remercie tout le personnel du CIRAD-FLHOR ainsi que les thésards et stagiaires pour leur aide et leur gentillesse.

AUTEUR : Hasina RAMARSON**TITRE** : Etude du mode d'action de quelques traitements sur le maintien de la coloration rouge du péricarpe de litchi

Région : Montpellier, FRANCE**Institution** : CIRAD-FLHOR**Encadrants** : Marie – Noëlle DUCAMP (CIRAD-FLHOR)
Manuel DORNIER (ENSIA-SIARC)**Mots - clés** : Litchi (*Litchi chinensis* Sonn. Cv. Wai chee et Kwai mi), brunissement, conservation, chitosane, acide citrique, atmosphère modifiée , anthocyanes, polyphenoloxydase (PPO), peroxydase (POD)

- RESUME -

Afin de maintenir la couleur rouge du péricarpe de litchi, deux traitements ont été étudiés : le trempage dans une solution d'acide citrique et de chitosane et l'utilisation d'atmosphère modifiée (film plastique). L'influence de ces méthodes de conservation sur le contenu anthocyanique et les activités PPO et POD ont été mesurés sur deux variétés de litchi (Kwai may et Wai chee).

Après récolte, ces deux variétés ont le même spectre anthocyanique en CLHP. Cependant, la variété Wai chee est plus riche en anthocyanes, en particulier en 3-rutinoside de cyanidol ($\times 2,75$). Par ailleurs, les activités enzymatiques sont plus élevées dans la variété Kwai may : PPO ($\times 6$) et POD ($\times 20$).

L'action des traitements ici considérés diffère selon la variété. Après trempage, la variété Wai chee perd une quantité importante d'anthocyanes (75 % de 3-rutinoside de cyanidol contre 25% dans la variété Kwai may). Parallèlement à cela, les activités PPO et POD y augmente de façon spectaculaire (respectivement $\times 8$ et $\times 20$) alors que dans la variété Kwai may, elles varient faiblement ($<15\%$)

Suite à l'application de l'atmosphère modifiée, les activités PPO et POD des deux variétés sont stabilisées. Cependant, la variété Wai chee reste sujette à des pertes importantes en 3-rutinoside de cyanidol (60% contre 27% dans la variété Kwai may).

AUTHOR : Hasina RAMARSON**TITLE** : Study of the action of some post-harvest treatments on the preservation of the red colour of litchi pericarp

Region : Montpellier FRANCE**Institute** : CIRAD FLHOR**Tutors** : Marie – Noëlle DUCAMP , Manuel DORNIER**Keywords** : Litchi (*Litchi chinensis* Sonn. Cv. Wai chee et Kwai mi), browning, postharvest treatment, chitosan, citric acid, modified atmosphere, anthocyanin, polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (POD)

- ABSTRACT -

To maintain the red color of the litchi pericarp, two treatments were studied: dipping in a solution of citric acid and chitosan and the use of a modified atmosphere (plastic film). The influence of these methods of preservation on the anthocyanin contents, the PPO and POD activities was measured on two litchi cultivars (Kwai may and Wai chee).

Immediately after harvest, the two cultivars have the same anthocyanin spectrum determined by HPLC. The Wai chee cultivar however is richer in anthocyanins, in particular in cyanidin-3 rutinoside ($\times 2,75$). In addition, the enzymatic activities are greater in the Kwai may cultivar : PPO ($\times 6$) and POD ($\times 20$).

The treatment effects differ according to the cultivar. After dipping, the Wai chee cultivar loses a considerable quantity of anthocyanin (75 % of cyanidin-3 rutinoside against 25 % in the Kwai may cultivar). At the same time, the PPO and POD activities 8- and 20-fold while in the Kwai may cultivar , they vary weakly (< 15 %).

The use of a modified atmosphere tends to stabilize the PPO and POD activities in both cultivars. However, the Wai chee cultivar remains subject to important losses in cyanidin-3 rutinoside (60 % against 27 % in the Kwai may cultivar).

Côte bibliothèque CNEARC / SIARC :

AUTEUR : Hasina RAMARSON**TITRE** : Estudio de diversos tratamientos sobre la conservación del color de la cascara del Litchi

Région : Montpellier, FRANCIA**Instituto** : CIRAD-FLHOR**Asesores** : Marie – Noëlle DUCAMP (CIRAD-FLHOR)

Manuel DORNIER (ENSIA-SIARC)

Palabras claves : Litchi (*Litchi chinensis* Sonn. Cv. Wai chee et Kwai mi), oscurescimiento, conservación, quitosano, ácido cítrico, atmósfera modificada, antocianato, polifenol oxidasa (PPO), peroxidasa (POD)

- RESUMEN -

Con el fin de mantener el color rojo del pericarpio del litchi, dos tratamientos han sido aplicados : la inmersión en una solución de ácido cítrico y de quitosano y la utilización de atmósfera modificada (film plástico). La influencia de estos tratamientos de conservación sobre el contenido de antocianatos y la actividad de PPO y POD ha sido medida en dos variedades de litchi (Kwai may y Wai chee).

Después de la recolección, estas dos variedades poseen un mismo espectro de antocianatos medido por HPLC. Sin embargo, la variedad Wai chee es más rica en antocianatos, en particular en 3-rutinosido de cianidol ($\times 2,75$). De otra parte, las actividades enzimáticas son más elevadas en la variedad Kwai may : PPO ($\times 6$) et POD ($\times 20$).

La acción de los tratamientos empleados poseen un efecto diferente según la variedad. Luego de la inmersión, la variedad Wai chee pierde una cantidad importante de antocianatos (75 % de 3-rutinosido de cianidol contra 25% en la variedad Kwai may). Consiguientemente las actividades de PPO y POD aumentan de manera importante ($\times 8$ y $\times 20$ respectivamente), pero en la variedad Kwai may, disminuye lavemente ($<15\%$)

Después de la aplicación de la atmósfera modificada, las actividades PPO y POD en las dos variedades se estabilizan. Sin embargo, la variedad Wai chee queda sujeta a dos pérdidas importantes en 3-rutinosido de cianidol (60% contra 27% en la variedad Kwai may).

Côte bibliothèque CNEARC / SIARC :

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	1
II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
II.1. L'enjeu économique du commerce de litchi.....	5
II.1.1. LA PRODUCTION MONDIALE.....	5
II.1.2. LE MARCHÉ EUROPÉEN.....	6
II.2. Présentation du fruit.....	7
II.2.1. BOTANIQUE.....	7
II.2.2. ANATOMIE DU FRUIT.....	8
II.2.3. PHYSIOLOGIE.....	9
II.2.4. LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE	10
II.3. Les caractéristiques biochimiques post-recoltes du péricarpe de litchi.....	12
II.3.1. LES ANTHOCYANES.....	12
II.3.2. LES POLYPHÉNOLOXYDASES.....	14
II.3.3. LES PEROXYDASES.....	16
II.3.4. LES GLYCOSIDASES.....	18
II.4. Le phénomène de brunissement	18
II.4.1. BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE.....	19
II.4.2. BRUNISSEMENT CAUSÉ PAR LA PERTE EN EAU DU PÉRICARPE	20
II.4.3. ANTHOCYANES ET BRUNISSEMENT	21
II.4.4. ÉTHYLÈNE ET BRUNISSEMENT	22
II.4.5. AUTRES CAUSES DE BRUNISSEMENT.....	22
II.5. Les traitements post-récoltes	23
II.5.1. CONTRÔLE DES PATHOLOGIES POST-RÉCOLTES.....	23
II.5.2. TRAITEMENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES POUR SUPPRIMER LE BRUNISSEMENT.....	24
II.5.3. TRAITEMENTS POUR RÉDUIRE LES PERTES EN EAU	26
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	29
III.1. Optimisation et mise au point des protocoles de dosage enzymatique.....	30
III.1.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	30
III.1.2. OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PPO.....	30
III.1.3. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA POD	35

III.1.4.	COMPLÉMENTS.....	37
III.1.5.	TRAITEMENTS DES DONNÉES.....	38
III.2.	Etude du mode d'action des traitements.....	38
III.2.1.	MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	38
III.2.2.	LES TRAITEMENTS.....	39
III.2.3.	LES TECHNIQUES D'ANALYSE.....	39
IV.	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	44
IV.1.	Optimisation des méthodes de dosage enzymatique.....	45
IV.1.1.	OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PPO.....	45
IV.1.2.	OPTIMISATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DE LA POD.....	48
IV.1.3.	STABILITÉ DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES.....	50
IV.1.4.	RÉPÉTABILITÉ DES MÉTHODES.....	52
IV.2.	Etude comparative de deux variétés : kwai may et wai chee.....	52
IV.2.1.	LES ANTHOCYANES DES COQUES.....	52
IV.2.2.	LES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES OXYDANTES.....	54
IV.3.	Influence des techniques de conservation sur différents facteurs.....	55
IV.3.1.	ETUDE DU MODE D'ACTION DU TRAITEMENT DE TREMPAGE.....	55
IV.3.2.	MODE D'ACTION DES ATMOSPHÈRES MODIFIÉES.....	60
V.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	63
VI.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	66
VII.	ANNEXES.....	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Le marché mondial de litchi (GHOSH, 2001).....	6
Tableau 2 : Composition de la pulpe de litchi pour 100g de pulpe (ZEE <i>et al.</i> , 1998).....	11
Tableau 3 : Composition en pigments de la coque de litchi (UNDERHILL <i>et al.</i> , 1997)	14
Tableau 4 : Spécificité de la PPO du péricarpe de litchi	15
Tableau 5 : Méthodes de dosage de la PPO du litchi	16
Tableau 6 : Méthodes de dosage de la POD du litchi.....	18
Tableau 7 : Caractéristiques des échantillons utilisés pour la mise au point de protocoles	30
Tableau 8 : Récapitulatif du choix des paramètres à optimiser pour le dosage de la PPO.....	34
Tableau 9 : Conditions opératoires de l'optimisation du dosage de la PPO.....	34
Tableau 10 : Conditions opératoires de l'optimisation du dosage de la PPO.....	36
Tableau 11 : Caractéristique des échantillons utilisés pour l'étude du mode d'action de quelques traitements	38
Tableau 12 : Gradient utilisé pour l'analyse CLHP des anthocyanes de la coque de litchi	40
Tableau 13 : Gradient utilisé pour le rinçage après l'analyse CLHP des anthocyanes de la coque de litchi	40
Tableau 14 : Détermination des constantes cinétiques de la PPO de litchi	46
Tableau 15 : La composition des anthocyanes de chaque variété.....	53
Tableau 16 : Comparaison de l'activité PPO et POD dans la coque de litchi	54
Tableau 17 : Mesure de pH avant et après trempage.....	59
Tableau 18 : Mesure de pH avant et après filmage	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition de la production mondiale de litchi (COLEACP, 1999).....	5
Figure 2 : Anatomie du fruit de litchi	8
Figure 3 :Structure de base des anthocyanes.....	12
Figure 4 : Transformation de la structure de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside en milieu aqueux (PERRET, 2001).....	13
Figure 5 : Schéma du brunissement enzymatique dans la coque de litchi (JIANG <i>et al.</i> , 2004a) ...	20
Figure 6 : Schéma de principe du protocole de base utilisée pour le dosage de la PPO	31
Figure 7 : Schéma de principe du protocole de base utilisée pour le dosage de la POD.....	35
Figure 8 : Courbe d'activité de la PPO en fonction de la concentration en catéchol	45
Figure 9 : Détermination de Km et Vm de la PPO (Méthode de Michaelis-Menten).....	45
Figure 10 : Détermination de Km et Vm de la PPO (Représentation de Lineweaver- Burk).....	46
Figure 11 : Variation de l'activité PPO en fonction de la quantité d'enzyme	46
Figure 12 : Effet de la quantité de PVPP sur l'activité PPO	47
Figure 13 : Stabilité de l'activité PPO au cours du temps	50
Figure 14 : Courbe d'activité POD en fonction de la concentration en H ₂ O ₂	48
Figure 15 : Détermination de Km et Vm de la POD (Méthode de Michaelis Menten).....	48
Figure 16 : Détermination de km et Vm de la POD (Représentation de Lineweaver- Burk).....	49
Figure 17 : Influence de la concentration en gaïacol sur l'activité POD	49
Figure 18 : Variation de l'activité POD en fonction de la quantité d'enzyme	50
Figure 19 : Comparaison du profil chromatographique de l'extrait anthocyanique du péricarpe des deux variétés de litchi)	52
Figure 20 : Comparaison du contenu anthocyanique des coques de deux variétés de litchi	53
Figure 21 : Comparaison des activités enzymatiques dans le péricarpe de deux variétés de litchi .	54
Figure 22 : Effet du traitement de trempage sur le contenu anthocyanique	55
Figure 23 : Influence du traitement de trempage sur l'activité PPO	56
Figure 24 : Influence du traitement de trempage sur l'activité POD.....	56
Figure 25 : Evolution de l'activité anthocyanase	58
Figure 26 : Effet du traitement de trempage sur la couleur de la coque	59
Figure 27 : Effet du filmage sur le contenu anthocyanique	60

I. INTRODUCTION

Figure 28 : Effet du filmage sur les activités enzymatiques (PPO et POD)	61
Figure 29 : Effet du filmage sur la couleur de la coque.....	62

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Le commerce mondial du litchi	74
Annexe 2 : Présentation de la structure d'accueil.....	75

LISTE DES ABREVIATIONS

PPO	: Polyphénoloxydase / Polyphenoloxidase
POD	: Peroxydase / Peroxidase
CHPL/HPLC	: Chromatographie Liquide Haute Performance / High Performance Liquid Chromatography
var / cv	: variété / cultivar
ACY	: Anthocyanes

Originaire d'Asie, le litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) est un fruit à haute valeur ajoutée qui prend de plus en plus d'importance sur le marché mondial, en particulier sur le marché européen. Le fruit connaît plusieurs problèmes post-récoltes dont le plus important est le brunissement du péricarpe. Bien que n'altérant en rien la qualité organoleptique de la pulpe, la perte de la couleur rouge vif diminue fortement la valeur commerciale du fruit.

Ce brunissement survient 1 à 2 jours après récolte, ce qui pose un problème car les marchés sont souvent éloignés des zones de production (Annexe 1). Dans le but de maintenir cette coloration rouge, plusieurs traitements ont été proposés dans la littérature. Cependant, pour les gros volumes de transaction à l'échelle internationale, le SOUFRAJE demeure le principal traitement post-récolte du litchi. Cette fumigation au dioxyde de soufre peut, si elle est mal maîtrisée, laisser des résidus qui atteignent la pulpe du fruit.

Les résidus chimiques présents dans les fruits et légumes frais sont soumis à la législation des pays importateurs. Il a été montré que les substances soufrées peuvent être dangereuses pour la santé humaine : elles peuvent initier des réactions asthmatiques chez les personnes allergiques (JIANG et FU, 1998b), et sont même soupçonnées d'être cancérogènes. Ainsi, aux Etats Unis, l'utilisation de soufre est interdite dans tout produit alimentaire autre que le raisin (PAULL *et al.*, 1998). En Europe, les législations sont de plus en plus contraignantes : elles abaissent les taux de résidus autorisés et tendent à interdire les traitements chimiques associés.

Suite à ce durcissement de la législation, des recherches ont été entreprises pour améliorer les méthodes de traitement existantes, afin de maîtriser les taux de résidus chimiques. Parallèlement à cela, un axe de recherche vise à trouver de nouvelles méthodes dans le but de substituer l'utilisation de substance chimique de synthèse, notamment le SO₂.

La mise au point de ces nouvelles méthodes suppose la connaissance du mécanisme de brunissement. A ce jour, ce phénomène n'est pas entièrement expliqué et de nombreuses hypothèses parfois contradictoires ont été émises. Le brunissement serait lié à la dégradation rapide des anthocyanes sous l'action d'enzymes telles que la PPO et la POD, donnant des sous-produits bruns (AKAMINE, 1960 ; JIANG *et al.*, 1997 ; HUANG *et al.*, 1990 ; ZAUBERMAN *et al.*, 1991 ; ZHANG *et al.*, 2004a). Ainsi, l'efficacité des traitements est évaluée sur leur action sur plusieurs paramètres impliqués dans le brunissement (couleur, concentration en anthocyanes et composés phénoliques, pH, ...), en particulier sur les activités enzymatiques.

Au CIRAD-FLHOR, selon les modes de transport, deux nouveaux traitements de conservation de la couleur des litchis ont été développés. Pour les litchis haut de gamme, transportés par avion, il s'agit de l'utilisation d'atmosphère modifiée (film plastique). Les litchis acheminés par bateau sont traités par trempage dans une solution de chitosane et d'acide citrique.

Notre étude vise un double objectif. Dans un premier temps, il s'agit d'avoir à disposition des méthodes efficaces pour doser les activités enzymatiques oxydantes (PPO et POD) dans la coque de litchi. Le deuxième objectif est d'étudier les modes d'action des traitements mis au point au CIRAD FLHOR sur le maintien de la coloration rouge de la coque litchi, en relation avec ces enzymes.

Ce travail a été effectué au sein du CIRAD FLHOR de Montpellier dont une présentation est donnée en annexe 2

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. L'ENJEU ECONOMIQUE DU COMMERCE DE LITCHI

II.1.1. La production mondiale

Avec l'intérêt croissant pour les fruits exotiques sur le marché international, la production de litchi a constamment pris de l'importance. De l'ordre de 350 000 t (UNDERHILL *et al.*, 1997) en 1997, la production mondiale de litchis était de 1,1 millions de t en 1999 (COLEACP), soit une augmentation de plus de 300% en 2 ans.

Durant les 30 dernières années, la hausse de la production en Afrique du Sud, en Australie, en Asie du Sud Est, aux Etats Unis et en Israël, a conduit le litchi à devenir une marchandise significative sur le marché international (UNDERHILL *et al.*, 1997). La Chine est le premier pays producteur (Fig 1). Les autres pays producteurs sont la Thaïlande, le Japon, la Nouvelle-Zélande et Madagascar (LE ROUX, 1999).

Les périodes de production s'étalent de mai à juillet pour les pays asiatiques, et de mi-novembre à mi-février pour l'hémisphère sud (LE ROUX, 1999)

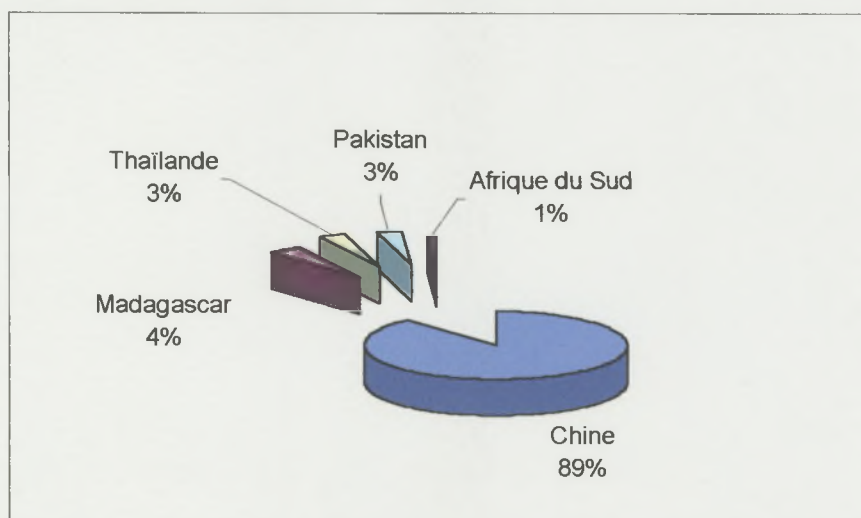


Figure 1 : Répartition de la production mondiale de litchi (COLEACP, 1999)

Dans certains pays comme l'Afrique du Sud et Israël, la production de litchi a l'exportation pour principal débouché. En 1992/1993, plus de 50% de la production d'Afrique du sud était affrété par bateau vers l'Europe. En 1997, Israël exportait plus de 70% de sa production vers l'Europe et les Etats Unis par bateau et par avion (UNDERHILL *et al.*, 1997)

II.1.2. Le marché européen

Le commerce du litchi concerne principalement les fruits en frais. Cependant, actuellement, l'exportation de litchi en conserve augmente de plus en plus, notamment vers la Malaisie, Singapour, les Etats Unis, l'Australie, le Japon et Hong Kong.

Le marché mondial de litchi peut être divisé en 3 grands groupes comme indiqué dans le tableau 1:

Tableau 1 : Le marché mondial de litchi (GHOSH, 2001)

Marchés	Capacité (10 ³ T)	Fournisseurs	Période d'approvisionnement
Hong Kong et Singapour	12	Chine, Taiwan, Thaïlande	Juin – juillet
Grande Bretagne, Allemagne, France	10 - 12	Madagascar	
		Afrique du Sud	Novembre – début mars
		Australie	Mai - juin
		Israël	Juillet - août
		Chine, Taiwan, Thaïlande Inde	Juin – juillet
Emirats Arabes Unis, Arabie Saoudite, Yemen, Liban, Dubai et Canada			

Le marché européen du litchi a connu une croissance fulgurante. Les importations européennes de litchis en provenance de l'Océan Indien (Madagascar, Afrique du Sud, île Maurice, île de la Réunion) sont passées de 2 000 à plus de 10 000t entre 1984 et 1994. En 1994, le marché du litchi était du même ordre que celui de la papaye et largement supérieur à celui du fruit de la passion. La France consommait 80% des litchis importés en Europe. Madagascar et l'Afrique du Sud se partageaient respectivement deux tiers et un tiers du marché européen (LOEILLET, 1994 ; COLEACP, 2000)

En 1999, le marché européen représentait 18 300t, soit environ 2% de la production mondiale.

II.2. PRESENTATION DU FRUIT

II.2.1. Botanique

Le litchi est en arbre fruitier subtropical indigène de régions sud de la Chine. Il est cultivé en Chine depuis au moins 4000 ans. Le litchi est un arbre persistant connu pour vivre plusieurs centaines d'années et qui atteint la hauteur de 14 mètres (ZEE *et al.*, 1998 ; CHAPMAN, 1983).

Il appartient à la famille des Sapindacées qui regroupe également des fruits exotiques tels que le rambutan (*Nephelium lappaceum*) et le logan (*Dimocarpus longan*).

Dans le genre litchi, deux espèces sont communément connues, *Litchi chinensis* Sonn. et *Litchi philippinensis* Radlk. *Litchi chinensis* Sonn. est la seule espèce de valeur commerciale.

Il existe plusieurs dizaines de variétés de litchis dans le monde. Une confusion existe dans leur classification et leur dénomination. Toutes les variétés peuvent être divisées en trois groupes :

Mauritius

Chinese

Madras

Le groupe Mauritius le plus commun, comprend les variétés H.L.H Mauritius, Muzafarpur, Late Large Red, Hazipur, Saharanpur et Rose Scended.

Le groupe Chinese comprend des variétés aux rendements de production faibles mais de grande qualité, Haak Yip, Shang Shou Huai, Kontad, Glutinour Rice et Three Months Red.

Le groupe Madras comprend des variétés de litchi très rouges mais de basse qualité, Kafri, Shorts Seedless, Johnstone's favorite, Emmerson, Durbhanga, Maries, Mooragusha, Red Mc Lean, et Bedana

En Chine, la classification regroupe les variétés de litchi en 7groupes : Kwai May, Siu chi, Joun fuon, Sam ut hung, Hak ip, No mai t'sz et Wai chee. Des tests biochimiques plus fins sont actuellement utilisés pour avoir une meilleure classification du litchi (ZEE *et al.*, 1998). La principale variété du commerce international est Mauritius.

L'Afrique du Sud base son industrie essentiellement sur une variété, H.L.H. Mauritius. A Hawaï, c'est la variété locale Groff, dérivée de la variété Haak Yip, qui est réputée. A Taiwan, 90% de la production est représentée par la variété Haak Yip. L'Inde utilise des variétés locales. Les variétés les plus cultivées en Australie sont Tai so et Bengal (CHAPMAN, 1983)

II.2.2. Anatomie du fruit

Les fruits se présentent sous forme de grappe de 2 à 20 fruits. Leur forme est fonction de la variété considérée : ronde, ovoïde, cardioïde ou réniforme. Ils sont constitués de trois couches (Fig2).

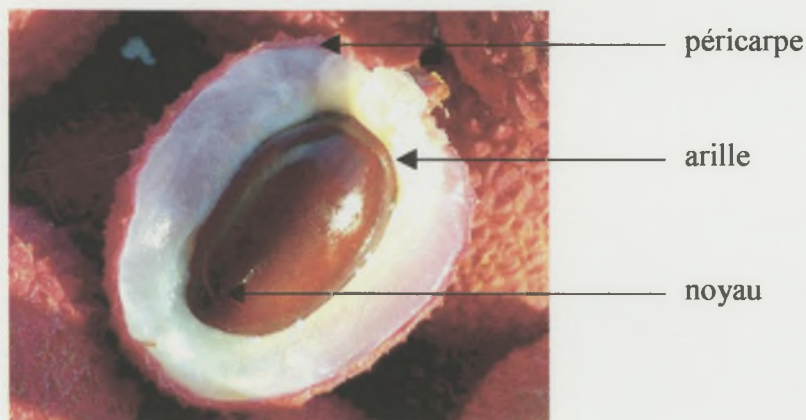


Figure 2 : Anatomie du fruit de litchi

II.2.2.1. Le péricarpe

La première couche est nommée « péricarpe », « pelure » ou « coque ». C'est la couche externe du litchi. Elle est mince (1-3mm d'épaisseur), dure et rugueuse. Sa surface est caractérisée par la présence de nombreuses petites parties écailleuses.

Le péricarpe est formé de trois tissus : l'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe.

L'épicarpe (1-3µm), partie externe de la coque, est formé d'une cuticule continue, une monocouche d'épiderme et du sclérenchyme sous épidermique (HOLCROFT et MITCHAM, 1996).

Le mésocarpe, contenant les structures vasculaires, est divisé en deux parties : le mésocarpe externe constitué d'une couche non continue de sclérenchyme et le mésocarpe interne constitué de parenchyme aérifère. L'endocarpe est constitué d'une couche unicellulaire (LE ROUX, 1999)

Vert au stade immature, le péricarpe prend une couleur rouge vif au cours de la maturation de la plupart des variétés. Les anthocyanes, pigments rouges majoritaires du péricarpe, sont synthétisés dans le péricarpe à partir de 12 à 15 semaines après l'anthèse, en parallèle avec une dégradation des chlorophylles. (RIVIERA-LOPEZ *et al.*, 1999)

Les pigments anthocyaniques sont liés aux vacuoles, apparaissant d'abord dans le mésocarpe supérieur situé juste sous les protubérances du péricarpe. La distribution des anthocyanes

s'étend progressivement en formant une couche continue dans le mésocarpe et l'épicarpe (UNDERHILL *et al.*, 1997 ; ZEE *et al.*, 1998)

II.2.2.2. L'arille

Le fruit du litchi est un fruit sec non déhiscent (HOLCROFT et MITCHAM, 1996). La partie charnue provient du développement du tégument de la graine, réalisant ainsi un faux fruit appelé : arille (SHI *et al.*, 2001). C'est la partie comestible du fruit. Lorsque le litchi mûrit, la pulpe devient charnue, juteuse et d'une couleur blanche tendant à la translucidité. Elle est à l'origine de la saveur sucrée, légèrement acide du litchi.

II.2.2.3. Le noyau

C'est une graine dicotylédone unique avec un testa lisse et brun (HOLCROFT et MITCHAM, 1996). Le noyau est ovoïde et sa grosseur varie de 1 à 2cm de long et de 6 à 12 mm de large.

II.2.3. Physiologie

II.2.3.1. Respiration

Le litchi est un fruit non-climactérique (CHEN *et al.*, 2001; UNDERHILL *et al.*, 1997), la maturation ne continue pas après la récolte. Des auteurs ont rapportés que l'intensité respiratoire des fruits diminue au cours de son développement : les fruits immatures (20 jours après anthèse) ont un taux respiratoire 8 à 10 fois plus élevé que le fruit mature (UNDERHILL *et al.*, 1997)

L'intensité respiratoire est importante, libérant du CO₂ jusqu'à 200mg.kg⁻¹.hr⁻¹ à la température ambiante, et 60-80mg. kg⁻¹.hr⁻¹ en conservation à froid (CHEN *et al.*, 2001). C'est un facteur important entravant la conservation à long terme. Cette intensité respiratoire importante va entraîner la consommation rapide des nutriments, conduisant à une perte de goût après stockage.

II.2.3.2. La production d'éthylène

En tant que fruit non climactérique, le litchi libère peu d'éthylène dont la plupart provient du péricarpe. (PAULL et CHEN, 1987 ; UNDERHILL *et al.*, 1997 ; CHEN *et al.*, 2001).

Durant le développement, l'éthylène diminue. Cependant, il a été observé un pic de production d'éthylène vers la moitié de la phase de développement, qui décline graduellement (CHEN *et al.*, 2001).

La production d'éthylène peut être significativement réduite en utilisant les basses températures (5°C), mais elle augmente rapidement à 25°C. (UNDERHILL *et al.*, 1997).

II.2.3.3. Appréciation de la maturité

Comme l'état de maturité du litchi ne change pas après la récolte, le fruit doit être cueilli à l'optimum de sa qualité organoleptique (apparence visuelle, arôme, goût). Bien que la couleur du péricarpe soit le plus communément utilisée comme indice de maturité, la relation entre cette couleur et la maturité du fruit varie selon les variétés, les régions de production, et les pratiques culturales. Pour pouvoir retenir la couleur du péricarpe comme un indice objectif, elle doit être appliquée à une variété déterminée, selon la région et les niveaux de gestion de la culture. Ce genre de distinction est cependant rarement fait dans le cadre du marketing du litchi.

Les caractéristiques physiologiques de la pulpe tendent à être retenues comme norme commerciale de maturité. Il a été démontré que l'ESS (Extrait sec soluble ou °Brix) de la pulpe augmente avec la maturité. Toutefois, plusieurs auteurs ont montré que les relations entre le °Brix, la qualité organoleptique de la pulpe et la couleur du péricarpe sont très variables (UNDERHILL *et al.*, 1997)

L'**acidité titrable** du litchi a été étudiée en détail dans une tentative de corrélation à la maturité. Il a été montré que cette corrélation varie en fonction de la saison. UNDERHILL et WONG (1990) ont observé que le ratio °BRIX/ACIDITE de la pulpe est très bien corrélé à la qualité organoleptique du fruit. Ce ratio est largement adopté internationalement comme norme commerciale de maturité pour le litchi.

Le litchi fait l'objet d'une norme de qualité du **Codex Alimentarius** (CODEX STAN 196-1995)

II.2.4. La composition biochimique

II.2.4.1. Composition moyenne du fruit mûr

En moyenne, un fruit mûr de variété « Mauritius » pèse approximativement 22g, dont 75% d'arille, 14-16% de péricarpe et 11-14% de noyau. (HOLCROFT et MITCHAM, 1996). La pulpe contient 77-83% d'eau, 0,8-0,9% de protéines et moins de 1% de lipide (Tab 2). Le litchi n'est pas une source significative de thiamine, riboflavine, calcium, phosphore et fer. Il serait une bonne source de vitamine C avec 40 à 100mg / 100 g de pulpe à la récolte. (HOLCROFT et MITCHAM, 1996).

L'extrait sec soluble des litchis matures varie d'une variété à l'autre et en fonction de l'environnement de culture. L'analyse de 23 variétés de Taiwan a donné des valeurs allant de 14 à 23°Brix.

La composition en sucres de la variété Brewster de Hawaïi présentait du saccharose (51%), du glucose (30,1%) et du fructose (18,8%). Pour la même variété, la composition en acide organique non volatiles comprenait les acides maliques (80,3%), citrique (10%), ascorbique (5,2%) et des traces d'acides succinique, malonique, phosphorique, lactique, glutarique et lévulinique (ZEE *et al.*, 1998 ; tableau n°2)

Tableau 2 : Composition de la pulpe de litchi pour 100g de pulpe (ZEE *et al.*, 1998)

Composants	Quantité	Composants	Quantité
Eau	77,6 g	Calcium	4,0 mg
Energie	80 cal	Phosphore	3,5 mg
Protéines	0,9 g	Fer	0,4 mg
Lipides	0,3 g	Thiamine	0,04 mg
Glucides	20,8 g	Riboflavine	0,08 mg
Fibres	0,2 g	Niacine	1,9 mg
Cendres	0,4 g	Acide ascorbique	40 mg

II.2.4.2. Evolution de la composition

Dans le litchi immature, les acides organiques principaux sont l'acide succinique et l'acide malique. Au cours du processus de maturation, la quantité d'acide succinique décroît jusqu'au sixième de sa valeur initiale tandis que l'acide malique ne subit qu'une diminution de moitié. La quantité d'acide citrique reste stable. Ces modifications s'accompagnent d'une variation de l'acidité titrable et de pH de l'arille.

La principale perte que subit le litchi récolté concerne l'acide ascorbique qui diminue de moitié en seulement quatre jours, et ce, quelle que soit la température de stockage. Or ce composé maintient les pigments sous forme colorée. En effet, l'oxydation de celui-ci produit du peroxyde d'hydrogène qui est connu pour favoriser la dégradation des pigments d'anthocyanines dans les produits alimentaires.

Après la récolte, l'ESS (Extrait Sec Soluble) décroît et les méthodes de stockage n'ont que peu d'effet sur cette diminution associée à celle du saccharose de l'arille.

Enfin les changements dans la quantité de phénols solubles semblent être associés à la sénescence et ressemblent à ceux que connaît l'acidité titrable.

II.3. LES CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES POST-RECOLTES DU PERICARPE DE LITCHI

II.3.1. Les anthocyanes

II.3.1.1. Présentation générale

Les anthocyanes sont des pigments communs des plantes. Elles sont localisées dans les vacuoles et sont relativement instables y compris dans les tissus intacts (UNDERHILL et CRITCHLEY, 1994). Ces pigments rouges hydrosolubles sont caractérisés par un noyau de base (Fig 3) : le noyau flavylum (phényl-2 benzopyrillium) qui peut être hydroxylé, méthylé, acylé et/ou glycosylé

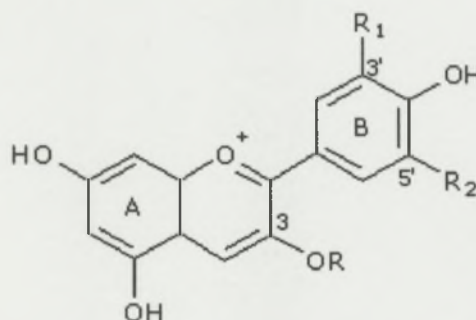


Figure 3 : Structure de base des anthocyanes

L'aglycone, groupement chromophore, est appelé anthocyanidine. Il est généralement substitué, notamment glycosylé en position 3, ce qui a pour effet de stabiliser le pigment, évitant sa décomposition rapide en composés incolores.

Anthocyanidines R*=H	R1	R2
Pélagonidine	H	H
Cyanidine	OH	H
Delphinidine	OH	OH
Péonidine	OCH ₃	H
Pétunidine	OCH ₃	OH
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃

* : Forme monoglucoside, R = glucose (LE ROUX, 1999 ; PERRET, 2001)

L'intensité de coloration des anthocyanes est directement liée à leur structure. Par exemple, une augmentation du niveau d'hydroxylation du cycle B induit un déplacement bathochrome (vers les plus hautes longueurs d'onde) du maximum d'absorption du cation flavynium. (LE ROUX, 1999). Ainsi, le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes (Fig 4). La forme flavylum, de couleur rouge, est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, soit en base carabinol (incolore), en chalcone (jaune) ou base quinonique (bleue). (PERRET, 2001)

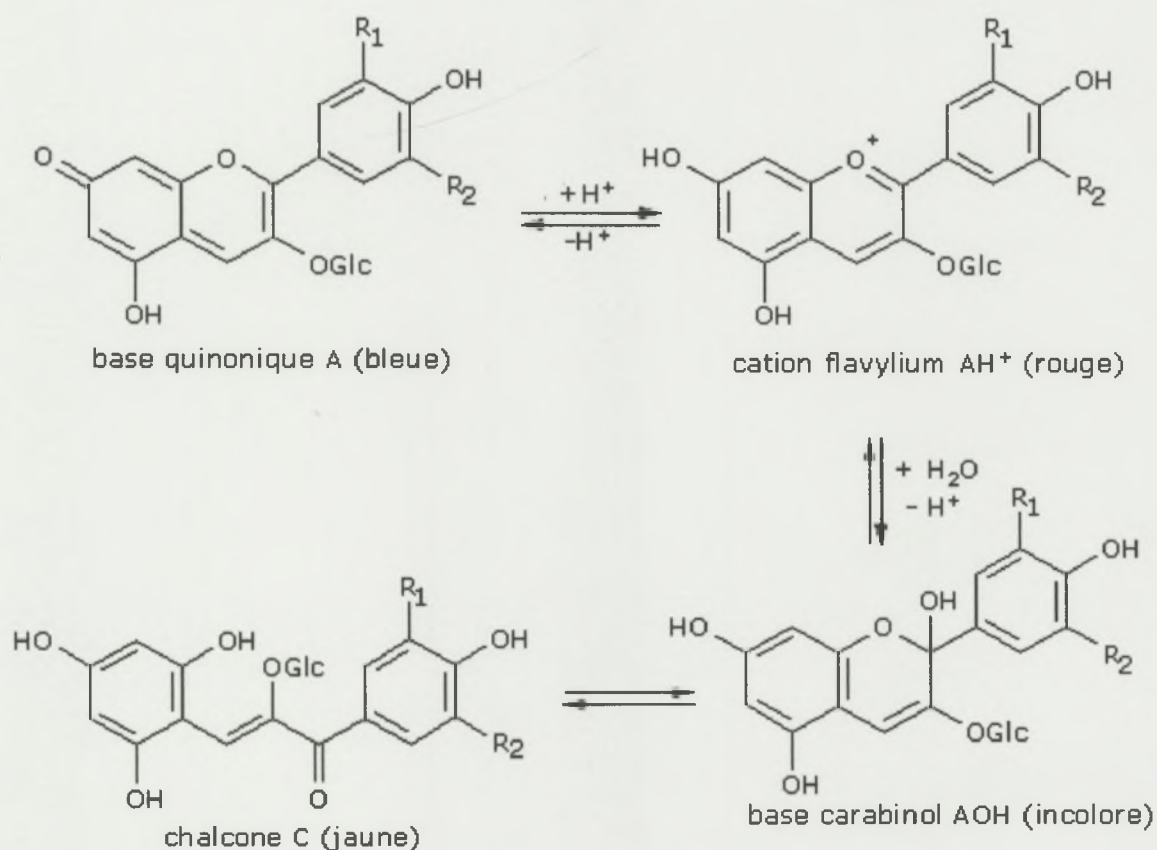


Figure 4 : Transformation de la structure de la malvidine-3-O-glucoside en milieu aqueux (PERRET, 2001)

II.3.1.2. Les anthocyanes du litchi

La couleur rouge du litchi est due aux pigments anthocyaniques ou anthocyanes. LEE et WICKER (1991) ont rapporté que le péricarpe contenait six anthocyanes, la majoritaire étant le 3-rutinoside de cyanidol. Le tableau 3 donne un aperçu de la composition en pigment du péricarpe de litchi.

Tableau 3 : Composition en pigments de la coque de litchi (UNDERHILL *et al.*, 1997)

Pigment	Concentration
<i>Chlorophylle (fruit mature vert)</i>	
Chlorophylle a	80µg / 100mg
Chlorophylle b	110µg / 100mg
<i>Chlorophylle (fruit mature rouge)</i>	25µg / 100mg
Chlorophylle a	14µg / 100mg
Chlorophylle b	
<i>Anthocyanes (ACY)</i>	
3-glucoside de cyanidol	>10% des ACY
3-galactoside de cyanidol	>10% des ACY
3-rutinoside de cyanidol	67% des ACY
3-glucoside de pelargonidol	>10% des ACY
3,5-diglucoside de pelargonidol	>10% des ACY
3-acetylglucoside de malvidol	15% des ACY

La synthèse d'anthocyanes coïncide avec la dégradation de la chlorophylle. Selon les variétés, les anthocyanes apparaissent entre 60 à 80 jours après anthèse d'après UNDERHILL *et al.* (1997), et entre la 12^{ème} et 15^{ème} semaines après anthèse pour RIVIERA-LOPEZ *et al.* (1999).

Dans le tissu frais, les pigments anthocyaniques sont localisés dans la moitié supérieure du mésocarpe jusqu'à l'épicarpe. (UNDERHILL et CRITCHLEY, 1993).

Dans les fruits verts, seul le 3-acetylglucoside de malvidol existe. Sa concentration diminue pour être supplantée dans le fruit mûr par le 3-rutinoside de cyanidol : 70% pour RIVIERA-LOPEZ *et al.* (1999) ; 97% pour LE ROUX (1999) ; 93,4% pour ZHANG *et al.* (2004).

II.3.2. Les polyphénoloxydases

II.3.2.1. Présentation générale

Le terme « polyphénoloxydases » (PPO) désigne un groupe d'enzymes qui catalysent l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène moléculaire. Les quinones ainsi générées sont des substances colorées et peuvent réagir avec d'autres produits pour donner des pigments bruns. (LE ROUX, 1999)

Selon la spécificité des substrats, on distingue deux types d'activités au sein des PPO :

- les catécholases (EC 1.10.3.2) ou o-diphénol : oxygène oxydoréductases. Elles ont une activité crésolase souvent suivie d'une réaction catécholase sur les o-diphénols
- les laccases (EC 1.10.3.1) ou p-diphénol : oxygène oxydoréductases qui catalysent l'oxydation de nombreux substrats en particulier les p-diphénols

La présence d'activité PPO cytoplasmique a été décrite, mais dans la plupart des cas, l'enzyme est membranaire. Sa situation membranaire permet sa séparation physique de ces Le contact entre l'enzyme et ses substrats ne pourra donc avoir lieu que suite à des perturbations au niveau des structures cellulaires substrats phénoliques qui sont localisés dans la vacuole., dégradation de tissus, déshydratation, destructurations cellulaires...(LE ROUX, 1999)

II.3.2.2. La polyphénoloxydase du péricarpe du litchi

La découverte de la PPO du péricarpe de litchi date de 1963. Sa nature est similaire aux laccases. Il a été montré plus en détail que les PPO catalysaient seulement l'oxydation des diphénols et des triphénols, et non pas celles des monophénols (CHEN *et al.*, 2001).

Des données sur la PPO du litchi indiquent que son pH optimal d'activité est de 7 et que sa température optimale est de 70°C (JIANG *et al.*, 1997b).

LE ROUX (1999) a montré que le pH optimal d'activité pour la PPO est de 6,8. Cette activité est pratiquement nulle en dessous de 10°C.

Selon JIANG (2001), le pH optimal d'activité de la PPO du litchi avec le 4-methylcatéchol est de 6,8. En dessous de pH 4,0 aucune activité enzymatique n'est détectée. La PPO a une température optimale remarquablement élevée de 68°C. L'enzyme reste stable dans une large gamme de température, montrant une faible activité après 30min à 75°C. A des températures plus élevées, la PPO du litchi est inactivée. L'enzyme perd 50% de son activité après environ 9 min à 85°C.

L'activité de la PPO du péricarpe de litchi varie selon les substrats (Tab 4).

Tableau 4 : Spécificité de la PPO du péricarpe de litchi

Substrats	Longueur d'onde de lecture (nm)	Activité relative (%)	
		1	2
4-methylcatéchol	410	100	100
Catéchol	400	167	171
Acide chlorogénique	390	0	0
p-cresol	400	0	0
Hydroquinone	400	-	0
Pyrogallol	334	3273	341
Resorcinol	400	0	0
Tyrosine	472	0	0

1 : JIANG *et al.*, 1997b 2 : JIANG, 2001

Tableau 5 : Méthodes de dosage de la PPO du péricarpe de litchi

Tampon d'extraction	Additif d'extraction	Séparation (Centrifugation)	Substrat	Tampon du mélange réactionnel	Température de la réaction	Référence pour l'activité	Expression de l'activité (durée mesure)	Auteurs
Phosphate 0,1M pH 6,6 4 ml / g de coque	PVPP 0,4 g / g de coque	12000g – 10min + filtration sur filtre millipore 0,45µm	4-methylcatéchol 0,2M	Phosphate pH 6,6 0,085M final		Masse de coque fraîche	Absorbance à 410nm/ min / g de coques fraîches (5min)	Zauberman* <i>et al.</i> , 1991.
Phosphate 0,05M pH 6,8 2,5ml / g de coque		19000g – 20min	4-methylcatéchol			Concentration en protéines (méthode Bradford)	Absorbance à 398nm/ min / mg de protéines	Zhang et Quantick, 1997.
Na ₃ PO ₄ 0,1mM pH 6,8 3ml / g de coque	PVPP 0,1g / g de coque	20000g – 20min	4-methylcatéchol 0,1M	Na ₃ PO ₄ 0,1mM pH 6,8	25°C	Concentration en protéines (méthode Bradford)	Absorbance à 410nm/ min / g de protéines (3min)	Jiang <i>et al.</i> , 1997a
Phosphate 0,1M pH 6,8 3 ml / g de coque	PVPP 0,2 g / g de coque	15000g – 15min	4-methylcatéchol 100mM 25mM final	Phosphate pH 6,8 0,0075M final	25°C	Concentration en protéines (méthode Bradford)	Absorbance à 410nm/ min / g de protéines (3min)	Jiang <i>et al.</i> , 1997b.
Phosphate 0,1M pH 6,8 3,3 ml / g de coque	PVPP 0,08 g / g de coque	20000g – 20min	4-methylcatéchol 25mM final	Phosphate pH 6,8 0,05M final	25°C	Concentration en protéines (méthode Bradford)	Absorbance à 410nm/ min / g de protéines	Jiang et Fu, 1998a.
Phosphate pH 6,8	PVPP 0,25 g / g de coque	8000g – 10min 20000g – 10min	4-methylcatéchol 23mM final			Masse de coque fraîche	Absorbance à 410nm/ min / g de coques (30 à 90s)	Lichter <i>et al.</i> , 2000
Phosphate 0,02M pH 6,8 5ml / g de coque	PVPP 0,1 g / g de coque	19000g – 20min	4-methylcatéchol 0,1M 25mM final	Phosphate 0,02M pH 6,8	25°C	Concentration en protéines (méthode Bradford)	Absorbance à 410nm/ min / g de protéines	Jiang <i>et al.</i> , 2004b

* : méthode de référence

Le pyrogallol, le catéchol et le 4-methylcatéchol sont de bons substrats pour la PPO de la coque de litchi. L'enzyme est inhibée par FeSO_4 et SnCl_2 , par contre elle est activée par MnSO_4 et CaCl_2 (JIANG *et al.*, 1997b).

JIANG et FU (1998b) et JIANG *et al* (1999) ont montré que le glutathion, la L-cystéine et l'acide citrique sont des inhibiteurs de la PPO alors que l'acide ascorbique et le n-propyl gallate ont peu d'effet.

II.3.2.3. Dosage de l'activité PPO dans le péricarpe de litchi

Les produits d'oxydation primaire des polyphénols sont des quinones qui ont un spectre d'absorption dans le proche ultra-violet et le visible. Ainsi, l'activité de la PPO peut être mesurée par spectrophotométrie, en dosant l'apparition du produit d'oxydation à sa longueur d'onde d'absorption.

Ces quinones sont très réactives et conduisent à des polymères colorés, elles peuvent également réagir avec les protéines et inactiver les enzymes étudiées. C'est pourquoi, l'étude de la cinétique de la réaction enzymatique ne doit prendre en compte que la vitesse initiale.

Les méthodes de dosage de la PPO comprennent principalement 3 phases :

une phase d'extraction dans du tampon dont le pH coïncide avec celui de l'activité optimale de l'enzyme. Le PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) est souvent utilisé comme additif. Ce dernier fixe les composés phénoliques et les sépare du surnageant qui contient la PPO.

une phase de séparation : elle permet de récupérer la solution aqueuse d'enzyme par centrifugation suivie éventuellement de filtrations.

la mesure de l'activité : elle se fait dans une cuve spectrophotométrique dans laquelle l'extrait enzymatique est mis en contact avec son substrat. Le substrat le plus fréquemment utilisé est le 4-methylcatéchol. Il est dissout dans du tampon qui est généralement celui d'extraction.

La réaction enzymatique est suivie par la mesure d'absorbance autour de 400nm pendant quelques min. Les expressions de l'activité sont multiples (Tab 5) .

Tableau 5 : Méthodes de dosage de la PPO du litchi

II.3.3. Les peroxydases

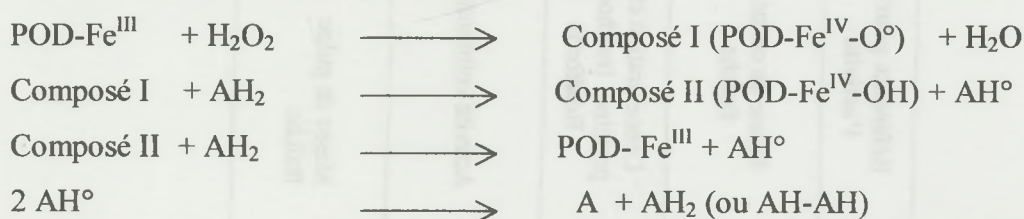
II.3.3.1. Présentation générale

Les peroxydases (PPO) jouent un rôle important dans la réponse aux stress de type blessures et attaques de pathogènes. Elles sont considérées comme des indicateurs de sénescence et de maturation des fruits.

Les POD oxydent des donneurs d'hydrogène de natures différentes en réduisant des peroxydes. Elles catalysent une séquence de réactions correspondant à un mécanisme binaire ping-pong. Le premier substrat (H_2O_2) se fixe sur l'enzyme, libère un premier produit (H_2O), puis le second substrat (exemple composés phénoliques, AH_2) se fixe comme cela est montré dans le schéma général ci-dessous.

L'action de la POD peut être inhibée par un excès de substrat tel que H_2O_2 ; dans ce cas, l'activité peut être retrouvée en présence de catalase qui décompose le peroxyde en eau et oxygène.

Schéma d'action de la POD : (LE ROUX, 1999)



Les POD ont la particularité de pouvoir oxyder la plupart des substrats phénoliques. Il reste néanmoins un facteur limitant pour son activité, à savoir la disponibilité en H_2O_2 dans les cellules. L' H_2O_2 fait partie du « cycle de l'oxygène » au niveau cellulaire, la réaction fondamentale étant la transformation de l'oxygène en eau. Il peut y avoir accumulation de H_2O_2 lorsque les systèmes de détoxification ne suffisent plus à neutraliser les formes actives, en cas d'agression de pathogène par exemple. Le H_2O_2 peut également être produit lors de la sénescence et au cours des réactions d'oxydo-réductions de certains composés.

L'activité des PPO et POD sur les substrats glycosylés est limitée du fait de l'encombrement stérique provoqué par le résidu *glycosyl*.

II.3.3.2. La peroxydase du péricarpe de litchi

Plusieurs auteurs ont mis en évidence la présence d'une activité POD dans le péricarpe du litchi (ZAUBERMAN *et al.*, 1991 ; ZHANG et QUANTICK 1997 ; LE ROUX, 1999).

Cependant, peu d'études portant sur les caractéristiques de cette enzyme ont été publiées . L'activité maximale de la POD du péricarpe est obtenue à pH 7 (LE ROUX, 1999). A basse température (4-10°C), l'activité demeure élevée. La température optimale d'activité de la POD est égale à 40°C. Au delà, l'activité chute rapidement pour être pratiquement nulle à partir de 70°C.

II.3.3.3. Dosage de l'activité POD

La méthode la plus fréquemment utilisée est la spectrophotométrie. Le dosage comprend les mêmes étapes que pour la PPO.

La différence se situe au niveau de la mesure de l'activité. Le mélange réactionnel contient du gaïacol et l'extrait aqueux d'enzyme. La réaction est initiée par addition de H_2O_2 .

Tableau 6 : Méthodes de dosage de la POD du litchi

Tampon d'extraction	Additif d'extraction	Séparation (Centrifugation)	Méthode de référence	Tampon du mélange réactionnel	Température de la réaction	Référence pour l'activité	Expression de l'activité (durée mesure)	Auteurs
Phosphate 0,1M pH 6,6 4 ml / g de coque	PVPP 0,4 g / g de coque	12000g – 10min + filtration sur filtre millipore 0,45µm	McCune, 1961	Phosphate pH 6,6		Masse de coque fraîche	Absorbance à 470nm/ min / g de coques fraîches (5min)	Zauberman <i>et al.</i> , 1991.
Phosphate 0,1M pH 7,1		1500g – 20min	Kochba <i>et al.</i> , 1977	Phosphate pH 7,1		Concentration en protéines (méthode Bradford)	Absorbance à 470nm/ min / mg de protéines	Zhang et Quantick, 1997.
Phosphate 0,05M pH 6,8 50 ml / 3 g de coque lyophilisée	PVPP 1g / g de coque lyophilisée	10000g – 20min		Phosphate pH 6,8	40°C	Activité volumique	Absorbance à 436nm / min / ml de solution enzymatique	Le Roux, 1999
Phosphate 0,05M pH 6,8 4 ml / g de pulpe		19000g – 20min	Macadam <i>et al.</i> 1992	Phosphate pH 7		Masse de pulpe fraîche	Absorbance à 470nm/ min/g de pulpe fraîche	Dong H., 2003..

L'apparition du tétragaïacol est suivie par la mesure d'absorbance entre de 436-470nm pendant quelques minutes. La méthode utilisée varie selon les auteurs (Tab 6)

Tableau 6 : Méthodes de dosage de la POD du litchi

II.3.4. Les glycosidases

II.3.4.1. Présentation générale

Les glucosidases, qui catalysent la rupture de la liaison osidique entre un résidu glycosyl et un groupement particulier, interviennent en fournissant des composés déglycosylés. Lorsqu'il s'agit d'anthocyanidols, ils sont spontanément dégradés du fait de leur instabilité. En revanche, les autres aglycones obtenus s'avèrent être bons substrats pour la PPO et la POD. Cependant, l'activité des glycosidases peut être inhibée par les produits d'oxydation d'o-diphénols tels que la catéchine.

Les β -glucosidases des plantes sont principalement localisées au niveau pariétal.

II.3.4.2. La β -glucosidase du péricarpe de litchi

LE ROUX (1999) a étudié les caractéristiques de la β -glucosidase du péricarpe de litchi. L'optimum d'activité a été observé à pH 5 et à une température de 45°C.

Une forte activité anthocyanase (anthocyane- β -glucosidase) a été observée par ZHANG *et al.* (2001) dans le péricarpe de litchi.

II.3.4.3. Dosage des glucosidases

L'extraction de la glucosidase se fait de la même façon que la PPO et la POD, à pH 6,8 (LE ROUX, 1999). Les substrats utilisés sont le p-nitrophényl- α -L-glucopyranoside et p-nitrophényl- α -L-rhaminopyranoside. La solution enzymatique et le substrat sont incubé pendant 20min à 40°C. Le p-nitrophénol libéré est ensuite révélé par addition de carbonate de sodium. L'intensité de coloration jaune produite est mesurée par lecture de l'absorbance à 400nm.

Pour ZHANG *et al.* (2001), l'extraction des anthocyanases se fait dans un tampon à pH 4. Le substrat utilisé est le 3-rutinoside de cyanidol. Après incubation (40°C, 10min) du mélange substrat plus solution enzymatique, de l'acide chlorhydrique est ajouté. L'absorbance est mesurée à 510nm pendant 3 à 5 min.

II.4. LE PHENOMENE DE BRUNISSEMENT

Le litchi connaît principalement 3 problèmes post-récoltes :

- Le brunissement du péricarpe
- Les pathologies surtout fongiques
- La perte en masse

Le brunissement du péricarpe du litchi est considéré comme le principal obstacle qui raccourcit la durée de vie du fruit. Bien qu'il ait peu d'effet sur les qualités organoleptiques de la pulpe, il réduit fortement la valeur commerciale du fruit.

Ce phénomène peut être du à différents types de stress, comme les conditions climatiques précédant la maturation du fruit, les maladies, la dessiccation et les chocs thermiques. (UNDERHILL *et al.*, 1997).

Plusieurs hypothèses ont été émises sur le mécanisme.

II.4.1. Brunissement enzymatique

Plusieurs chercheurs tendent à attribuer le brunissement du péricarpe à l'activité PPO puisque cette enzyme catalyse des réactions aboutissant à la formation de pigments bruns. Cependant, le substrat naturel de la PPO dans le péricarpe du litchi n'a pas été confirmé (PANG *et al.*, 2001). Les pigments rouges de la coque du litchi sont des anthocyanes, et les études sur le mécanisme de brunissement ont montré que les anthocyanes ne peuvent pas être des substrats de la PPO. (PEDROT et MORIS, 1990 ; KADER *et al.*, 1998)

Par ailleurs, les résultats des études sur l'activité PPO durant la conservation du litchi sont contradictoires. LIN *et al.* (1988) ont démontré une rapide augmentation de l'activité polyphénoloxydase durant les premières 48 heures de conservation des fruits. ZAUBERMAN *et al.* (1991) n'ont cependant pas observé de changement significatif de l'activité PPO durant la même période, alors que UNDERHILL et CRITCHLEY (1993a) ont reporté une baisse progressive de l'activité PPO.

Le rôle déjà controversé de la PPO dans le brunissement, se complique par la présence de la peroxydase (ZAUBERMAN *et al.*, 1991). Des études ont montré que l'activité POD dans le péricarpe du litchi est plus importante que celle de la PPO. Comme le brunissement s'aggrave, l'activité de la POD augmente et le contenu en phénols diminue (CHEN, 2001). Récemment, JIANG *et al.* (2004a) ont proposé un schéma récapitulatif du brunissement enzymatique du péricarpe de litchi après récolte (Fig 5).

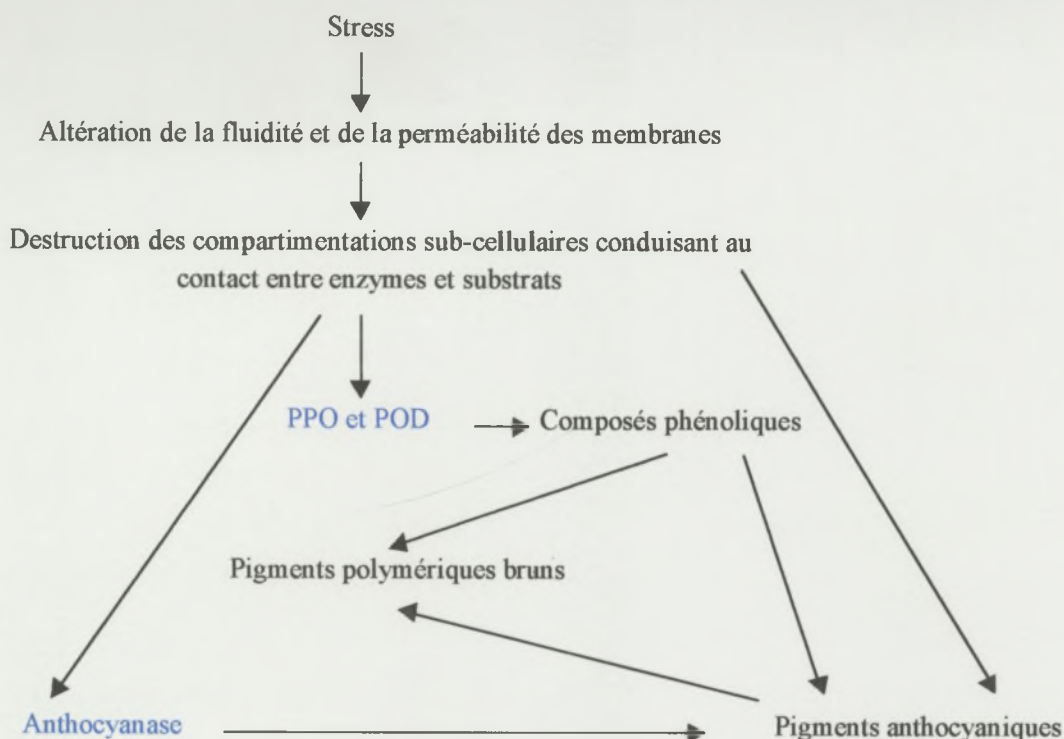


Figure 5 : Schéma du brunissement enzymatique dans la coque de litchi (JIANG *et al.*, 2004a)

II.4.2. Brunissement causé par la perte en eau du péricarpe

On observe une perte de masse importante du litchi au cours de sa conservation. Ce phénomène coïncide principalement avec la perte en eau, qui concerne surtout le péricarpe. Effectivement, JIANG et FU (1999) ont rapporté qu'il n'y avait pas de perte significative de masse concernant l'arille et le noyau. Dans les conditions ambiantes (25°C ; 60% HR), 50% de l'humidité initiale du péricarpe est perdue en 48 heures (UNDERHILL et CRITCHLEY, 1994)

La structure du péricarpe de litchi favorise les pertes en eau, et il n'existe pas de tissu conducteur entre le péricarpe et la pulpe du fruit. Ainsi, il n'y a pas moyen pour le péricarpe d'absorber de l'eau pour que la pulpe puisse se réapprovisionner. En outre, le développement de microcraquelures à la surface du péricarpe durant la conservation du litchi est relié de près au phénomène de brunissement (HARPAZ *et al.*, 2001)

Le degré de brunissement du tissu est proportionnel au taux de dessiccation du péricarpe (UNDERHILL et CRITCHLEY, 1994). Quand les pertes en eau atteignent un certain niveau, le péricarpe brunit. Ces pertes en eau conduisent à des déformations cellulaires qui aboutissent

finalement à la déstructuration des tissus (CHEN *et al.*, 2001). Cette perturbation de la structure des cellules se traduit par l'augmentation de la perméabilité des membranes, permettant ainsi le contact des enzymes avec leurs substrats. Ce phénomène accélère le brunissement.

En même temps, les pertes en eau conduisent à la condensation des substances colorées du péricarpe, assombrissant ainsi sa couleur. Durant la conservation du litchi à température ambiante, les premières étapes de brunissement sont surtout dues à une perte rapide en eau du péricarpe. Ceci entraîne une augmentation du pH et une décoloration des anthocyanes, et un brunissement rapide s'ensuit. (ZHANG *et al.*, 1997)

UNDERHILL et CRITCHLEY (1993b) distinguent le brunissement à la température ambiante et le brunissement induit par la chaleur. A température ambiante, le brunissement concerne uniquement l'épicarpe sans décoloration du mésocarpe, même si cette zone représente une forte concentration d'anthocyanes. Par contre, le brunissement provoqué par la chaleur est uniformément réparti dans tout le péricarpe, indépendamment de la localisation initiale des anthocyanes.

II.4.3. Anthocyanes et brunissement

Plusieurs auteurs tendent à relier le brunissement du péricarpe à une dégradation des anthocyanes sous l'action de la PPO (AKAMINE, 1960 ; HUANG *et al.*, 1990, JIANG, 2000) ou sous l'action de la POD (FINGER *et al.*, 1997 ; ZHANG *et al.*, 2004a). JIANG (2000) a cependant démontré que cette réaction impliquait une interaction anthocyanes-PPO-phénol, car la PPO seule n'a pas d'effet sur les anthocyanes. Les anthocyanes sont alors dégradées par co-oxydation impliquant des o-quinones formées enzymatiquement à partir de phénols.

Par ailleurs, en présence d'acide ascorbique, sucres, acides aminés et oxygène, les anthocyanes peuvent être irréversiblement dégradées par la PPO et la POD pour produire certains types de pigments bruns (CHEN *et al.*, 2001).

Concernant le rôle éventuel des anthocyanes, ZHANG et al (2001) suggèrent que le brunissement du péricarpe de litchi peut impliquer :

- une co-oxydation des phénols et anthocyanes par la PPO avec la formation de o-quinone
- l'hydrolyse des anthocyanes par l'anthocyanase, conduisant à la formation d'anthocyanidine qui accélère la dégradation enzymatique des anthocyanes.

L'anthocyane majoritaire du péricarpe est le 3-rutinoside de cyanidol. Son ouverture produit un o-phenol, ayant une structure similaire au catéchol (bon substrat pour la PPO) qui pourrait accélérer le brunissement enzymatique.

Toutefois, le brunissement ne peut être attribué uniquement à la dégradation des anthocyanes. Le pH joue un grand rôle dans le changement de couleur des pigments (UNDERHILL *et al.*, 1994 ; ZHANG *et al.*, 2001). Par ailleurs, la pigmentation se trouve dans la partie supérieure du mésocarpe et dans l'épicarpe. UNDERHILL et CRITCHLEY (1993b) ont démontré que le brunissement est très localisé et restreint à l'épicarpe. L'absence de brunissement dans le mésocarpe est en contradiction avec les auteurs qui supposent que le sous produit de la dégradation des anthocyanes provoque le brunissement.

II.4.4.Ethylène et brunissement

Bien que l'éthylène soit produit en petite quantité dans le litchi, il est concentré dans le péricarpe. Des études ont montré que le péricarpe contenait 86 fois plus d'éthylène que la pulpe et le noyau.

Les activités de PPO et POD peuvent être augmentées par un traitement avec de l'éthylène exogène. L'activité de la PPO est plus sensible à l'éthylène que celle de la POD. Ainsi, il est possible d'affecter le brunissement du péricarpe à travers l'effet de l'éthylène sur les activités des PPO et POD. L'effet de l'éthylène ne s'exprime pas pendant la conservation à froid, mais seulement après que la chaîne de froid soit rompue (CHEN, 2001).

II.4.5.Autres causes de brunissement

En plus des facteurs déjà mentionnés, il existe plusieurs autres facteurs qui peuvent stimuler le brunissement du litchi : lésion mécanique, lésion due au dioxyde de soufre, le froid, la sénescence.

En résumé, le brunissement du péricarpe du litchi peut être causé par plusieurs facteurs. Le brunissement développé lors de la conservation à froid est différent par nature de celui développé à température ambiante.

A température ambiante, le brunissement du fruit résulte principalement de la perte en eau. Ce type de brunissement est uniforme, seul le péricarpe brunit alors que la pulpe conserve ses qualités sensorielles. Au début du brunissement, il est possible de retrouver la couleur rouge du péricarpe avec de l'acide, mais une fois que la totalité du péricarpe est brune, ceci n'est plus possible.

Dans le cas de la conservation à froid, le brunissement n'est pas uniforme sur tout le péricarpe. Il apparaît sous forme de taches brunes de différentes tailles, qui continuent de se développer jusqu'à ce que le fruit entier soit brun. Si les fruits avec des taches brunes sont transférés à température ambiante, la vitesse de développement des taches est plus importante.

II.5. LES TRAITEMENTS POST-RECOLTES

Les stratégies post-récolte du litchi peuvent être groupées en 3 catégories :

- éviter le dessiccation du fruit par le contrôle de l'environnement ou par des manipulations chimiques ou génétiques
- supprimer le phénomène de brunissement par des moyens physiques ou chimiques
- contrôler les organismes pathogènes

II.5.1. Contrôle des pathologies post-récoltes

Les pathologies post-récoltes peuvent causer de sérieuses pertes en fruits dans le commerce. Un large spectre de pathogènes fongiques provoquent des maladies post-récoltes chez le litchi. Les principaux micro-organismes provoquant des dégradations post-récolte chez le litchi sont : la rouille duveteuse (*Perenophythora litchii*), l'anthracnose et la pourriture aigre. (CHEN *et al.*, 2001)

Les levures, responsables de la fermentation, constituent la population majoritaire de la flore microbienne du litchi (HOLCROFT et MITCHAM, 1996).

Quelques espèces bactériennes ont également été isolées à partir de litchis pourris, bien qu'aucune tentative n'ait été entreprise pour confirmer leur pathogénicité.

A cause de sa richesse nutritionnelle et de la structure spéciale du péricarpe (microcraquelure), le litchi peut facilement être infecté par les microorganismes. Actuellement, la maladie la plus sérieuse qui sévit sur le litchi est la rouille duveteuse. Selon l'étendue de la maladie, les taches deviennent de plus en plus larges. Au début, seules les cellules épidermiques sont attaquées. Après, la maladie s'étend jusqu'à la pulpe. En général, quand le diamètre des tavelures atteint 0,5 cm, la pulpe commence à être affectée aussi (CHEN *et al.*, 2001).

Les moyens de maîtrise des pathologies post-récolte comprennent l'utilisation de fongicides, la réfrigération, les traitements thermiques, l'hygiène des vergers, des emballages bien adaptés, des matériels et matériaux de conditionnement corrects et des mesures de maîtrise des attaques d'insectes (HOLCROFT et MITCHAM, 1996 ; UNDERHILL *et al.*, 1997).

Une large gamme de fongicide a été évaluée pour le contrôle des pathologies du litchi, tels que le benomyl, prochloraz, imazalil. Le dioxyde de soufre est également connu comme ayant un effet fongicide dans certaines conditions. (UNDERHILL *et al.*, 1997 ; JIANG *et al.*, 2001)

Cependant, le contrôle chimique des maladies post-récoltes est menacé par la préférence du consommateur et les publications réglementaires concernant les résidus de pesticides dans les fruits et leur effet négatif sur l'environnement. Ainsi, on tend actuellement à se tourner vers les luttres biologiques. JIANG *et al.* (2001) ont évalué l'activité antifongique de certaines bactéries. Tant le *Bacillus subtilis* que son extrait sont efficaces pour lutter contre le *Perenophythora litchii*.

II.5.2. Traitements physiques et chimiques pour supprimer le brunissement

II.5.2.1. La fumigation au dioxyde de soufre

Actuellement, la méthode de conservation post-récolte du litchi la plus utilisée est la fumigation au dioxyde de soufre (SO₂), suivie ou non d'un traitement de trempage dans l'acide chlorhydrique dilué (pH 0,5 ou 1,0) et souvent associé à la réfrigération des fruits traités. Le SO₂ est un oxydant fort qui bloque les réactions d'oxydation à l'origine du brunissement de la peau, en inhibant la PPO. Par ailleurs, il participe à l'acidification du contenu cellulaire de la coque, stabilisant ainsi les anthocyanes. C'est également un antifongique (ZAUBERMAN *et al.*, 1991)

Le soufrage consiste à placer les fruits pendant 20 à 30 min dans des containers fermés contenant du soufre en combustion. Les fruits sont ensuite conditionnés en cartons et transportés par bateau sur les marchés européens. Immédiatement après le traitement, les fruits sont d'un jaune uniforme dû à la formation d'un complexe incolore anthocyanes-SO₃. La couleur rouge revient progressivement avec la dissociation du sulfite des anthocyanes. La reprise dure 24 à 48 heures selon la température de stockage, avec des fruits qui prennent finalement une couleur orange terne. Cette impossibilité de revenir à une couleur rouge vive est considérée comme une des limitations de cette technique (UNDERHILL *et al.*, 1992). Cependant, un trempage à l'acide chlorhydrique (HCl) dilué consécutif au soufrage permet de régénérer la couleur rouge du péricarpe. En effet, l'abaissement du pH de la coque entraînerait la réacidification des glycosides d'anthocyane qui passeraient de leur forme incolore à leur forme rouge (ZAUBERMAN *et al.*, 1991). Toutefois, il a été remarqué une pénétration de HCl dans la pulpe du fruit au bout de 24 heures ; l'acide chlorhydrique n'étant qu'un auxiliaire de fabrication ne doit pas laisser de résidu . C'est pourquoi, des essais ont porté sur l'utilisation de l'acide citrique qui permet une recoloration plus lente du fruit mais assure une bonne conservation du goût.

Un autre inconvénient de la fumigation est la perte importante d'humidité des fruits, favorisant un dépérissement rapide. En outre, la fumigation est actuellement sérieusement remise en question. A l'issue du soufrage, des composés soufrés pénètrent le péricarpe et la pulpe des litchis. Cette accumulation dans la pulpe est plus importante après trempage dans de l'acide. En effet, la dissociation du complexe anthocyanine-SO₃ est tellement rapide que le SO₂ libéré migre vers l'arille. Ces substances soufrées peuvent être dangereuses pour la santé humaine : elles peuvent initier des réactions asthmatiques chez les personnes allergiques (JIANG et FU, 1998b), et sont même soupçonnées d'être cancérogènes. En conséquence, les Etats Unis ont interdit l'utilisation d'agents de sulfitage sur les fruits et légumes frais, avec le raisin comme seule exception. La réglementation française exige pour sa part que la teneur en résidus d'anhydride sulfureux n'excède pas 10 mg/kg de pulpe fraîche et 250 mg/kg de coque.

L'action du SO₂ sur le contrôle du pourrissement post-récolte étant connue, des techniques dérivées ont été testées. L'association bisulfite de sodium/acide chlorhydrique concentrerait les résidus dans la partie non comestible (JIANG *et al.*, 1997a)

Cependant, le durcissement de la réglementation en matière de résidus soufrés a conduit à la recherche de solutions alternatives.

II.5.2.2. Autres traitements

Pour préserver la couleur rouge et les qualités du litchi, JIANG *et al.* (1997a) proposent un trempage des fruits dans une solution de bisulfite de sodium contenant 0,5% d'acide chlorhydrique, pendant 8 min. Les fruits sont conservés entre 15-30°C à une humidité relative de 90-95%. Les résidus sulfites sont essentiellement localisés dans le péricarpe et la pulpe en contient 4,2 ppm après 6 jours de conservation.

JIANG et FU (1998a) proposent un trempage en solution de N6-benzyladenine (6-BA) pour retarder le brunissement et maintenir les qualités du litchi. Le 6-BA est une substance de croissance synthétique des plantes utilisée en Chine pour retarder la sénescence post-récolte des fruits et légumes. Le traitement réduit la perte de masse, l'acidité titrable, l'acide ascorbique et le niveau d'activité de la PPO. Les résidus 6-BA sont principalement localisés dans le péricarpe et sont inférieurs à 0,05 mg/kg dans la pulpe après 6 jours de conservation.

JIANG et FU (1998b) proposent l'utilisation combinée de glutathion et d'acide citrique pour ralentir le brunissement du fruit. Le trempage des litchis est réalisé dans une solution aqueuse de

glutathion à 10 mmol/L et d'acide citrique à 100 mmol/L. Ils observent une inhibition de l'activité PPO à 85%

LICHTER et al. (2000) proposent une méthode de conservation qui consiste à brosser les litchis à l'eau chaude et les tremper dans de l'acide chlorhydrique dilué (4%) l'activité PPO mesurée est réduite par rapport aux litchis témoins, mais pas autant que l'inhibition observée avec les traitements au SO₂. Les auteurs suggèrent que ce traitement agit en meurtrissant la couche externe du péricarpe, permettant à la coque d'être uniformément exposée à l'acide, ce qui inhiberait l'activité PPO et maintiendrait les anthocyanes dans leur forme rouge.

Les résultats obtenus par JIANG et LI (2003) suggèrent qu'un allongement de la durée de vie à température ambiante est envisageable quand les fruits ont été acclimatés à des basses températures.

Un traitement avec du HCl (1%) pourrait être considéré pour une application commerciale (JIANG *et al.*, 2004b). Les fruits ainsi traités, après conservation à -18°C pendant 12 mois, ont une durée de vie de 12 heures à température ambiante, avec une couleur rouge uniforme et une qualité acceptable.

II.5.3. Traitements pour réduire les pertes en eau

II.5.3.1. Trempage dans une solution de chitosane

L'utilisation d'enrobages semi-perméables a montré de bons résultats pour l'amélioration de denrées périssables. Cependant, peu de recherches sur les enrobages semi-perméables ont été effectuées pour le litchi. Il a été observé que le brunissement du péricarpe était retardé par un enrobage de polysaccharides ou d'esters de sucrose et d'acide gras (ZHANG et QUANTICK, 1997).

Le chitosane, un polysaccharide cationique de haut poids moléculaire, est soluble dans les acides organiques dilués et peut théoriquement être utilisé comme enrobage de conservation des fruits. Il est obtenu après hydrolyse de la chitine. Il inhibe la croissance de plusieurs champignons et induit la chitinase, une enzyme de défense du fruit. En raison de sa capacité à former un film semi-perméable, l'enrobage au chitosane modifierait l'atmosphère interne et la transpiration du fruit. Par ailleurs des essais récents ont montrés que le chitosane n'était pas toxique et qu'il était biologiquement sain pour les animaux (ZHANG et QUANTICK, 1997).

L'effet du chitosane lors de la conservation du litchi varie selon les auteurs. ZHANG et QUANTICK (1997) traitent les litchis par trempage dans une solution de chitosane à 1 ou 2%, après un premier trempage dans du thiabendazole à 0,1%. Les litchis sont conservés à 4°C à une humidité relative de 90%. L'utilisation de chitosane retarde le changement de composition en anthocyanes, flavonoïdes et phénols totaux. Elle retarde l'augmentation de l'activité polyphénoloxydase (PPO), réduit la perte de masse et inhibe partiellement l'activité peroxydase. La dégradation du fruit est ainsi retardée. Le chitosane formerait une barrière protectrice à la surface du fruit, réduirait l'apport en oxygène nécessaire à l'oxydation enzymatique des composés phénoliques et limiterait la dessiccation du fruit.

MAIRE (2002) a montré qu'à l'inverse des litchis soufrés, l'inhibition de l'activité PPO n'est pas observée pour les litchis traités au chitosane et acide citrique. Le traitement au chitosane stabilise la couleur rouge et limite la dégradation des anthocyanes du péricarpe. Il n'empêche pas la dessiccation de la pulpe du fruit à température ambiante.

II.5.3.2. Usage de film plastique

Pour allonger la durée de vie du litchi, il est possible de créer autour des fruits fraîchement cueillis une atmosphère modifiée. La création d'une atmosphère modifiée sous entend l'utilisation d'un film d'emballage dont le rôle est de :

- créer dans le volume de conservation une atmosphère favorable à la conservation du produit
- limiter la déshydratation
- éviter les contaminations

Le végétal respire, rejette du CO₂ dans le volume mort de l'emballage et utilise l'oxygène de ce volume. Cette modification de l'atmosphère interne crée une différence de pression partielle entre l'intérieur et l'extérieur du système. Ceci provoque l'apparition de diffusion gazeuse entre l'intérieur et l'extérieur du sachet : l'oxygène de l'air tend à rentrer et le CO₂ à sortir. On a donc un système dynamique qui peut se stabiliser autour d'un équilibre gazeux préconisé.

Cet équilibre dépend notamment :

- de l'intensité respiratoire du végétal, de la quantité conditionnée, de la température de stockage
- de la perméabilité du film et de la surface d'échange.

Emballer les fruits constitue un des moyens les plus simples et les plus communément utilisés pour limiter les pertes en eau. Traditionnellement, il s'agissait de conserver les fruits dans des sacs d'herbes tissées, des paniers de bambou, des jarres en argile. PAULL et CHEN (1987) ont montré que le filmage des litchis avec du polyéthylène réduit le phénomène de brunissement.

Pour trouver l'emballage le plus efficace, différents types de matières ont été utilisés : papiers, tissus, films plastiques, sacs en PVC, sacs plastiques perforés... Les résultats sont très variables avec soit une importante condensation qui favorise les maladies, soit un contrôle inadéquat de l'humidité. Des essais ont été entrepris pour développer des absorbeurs d'humidité, mais n'ont connu que peu de succès commerciaux. (UNDERHILL *et al.*, 1997)

II.5.3.3. Autres

JIANG et FU (1999) proposent une conservation sous atmosphère contrôlée (3-5% O₂ et 3-5% CO₂) à haute humidité relative (90%). La concentration en anthocyanes diminue avec la durée de conservation, mais les fruits placés à une humidité relative haute (90%, 20°C) ont moins de perte en anthocyanes. L'activité PPO mesurée est plus haute à basse humidité relative (60-70%). Le pH initialement bas augmente avec la dessiccation du péricarpe, mais il augmente moins à humidité relative haute.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les expérimentations entreprises au cours de ce travail peuvent être groupées en 2 catégories :

- dans un premier temps, il s'agit d'avoir à disposition des outils efficaces pour le dosage de la PPO et la POD
- la deuxième catégorie concerne l'étude du mode d'action de quelques traitements sur le maintien de la coloration rouge de la coque du litchi.

III.1. OPTIMISATION ET MISE AU POINT DES PROTOCOLES DE DOSAGE

ENZYMATIQUE

Les activités enzymatiques sont destinées à devenir un critère d'observation de l'action des traitements subis par les litchis. Ainsi, le but de cette étude est de disposer de **technique simple, fiable et efficace** pour les doser.

Cette partie est donc consacrée à :

- l'optimisation d'une méthode de dosage de l'activité PPO actuellement utilisée au CIRAD-FLHOR
- la mise au point d'un protocole de dosage de la POD

III.1.1. Matériel végétal

Les litchis utilisés sont issus de deux variétés qui approvisionnent le marché européen : la variété Wai chee provenant d'Espagne, et la variété Kwai may originaire de l'Océan Indien. Leurs caractéristiques sont données dans le tableau 7.

Tableau 7 : Caractéristiques des échantillons utilisés pour la mise au point de protocoles

Référence	Variété / maturité	Origine	Traitements subis	Conservation des coques
1	Wai chee - mature	Espagne	Aucun	Lyophilisation
2	Kwai may - mature	Madagascar	Aucun	Congélation

III.1.2. Optimisation du protocole de dosage de la PPO

Cette étude a été menée sur l'échantillon 1 (Var Wai chee).

III.1.2.1. Méthode de base utilisée pour le dosage de la PPO

Les extraits aqueux de coque de litchi sont préparés comme suit. Le matériel d'extraction est préalablement refroidi à 20°C et les réactifs et solutions d'extraction à 4°C. L'extraction est conduite à 4-6°C dans un bac d'eau glacée.

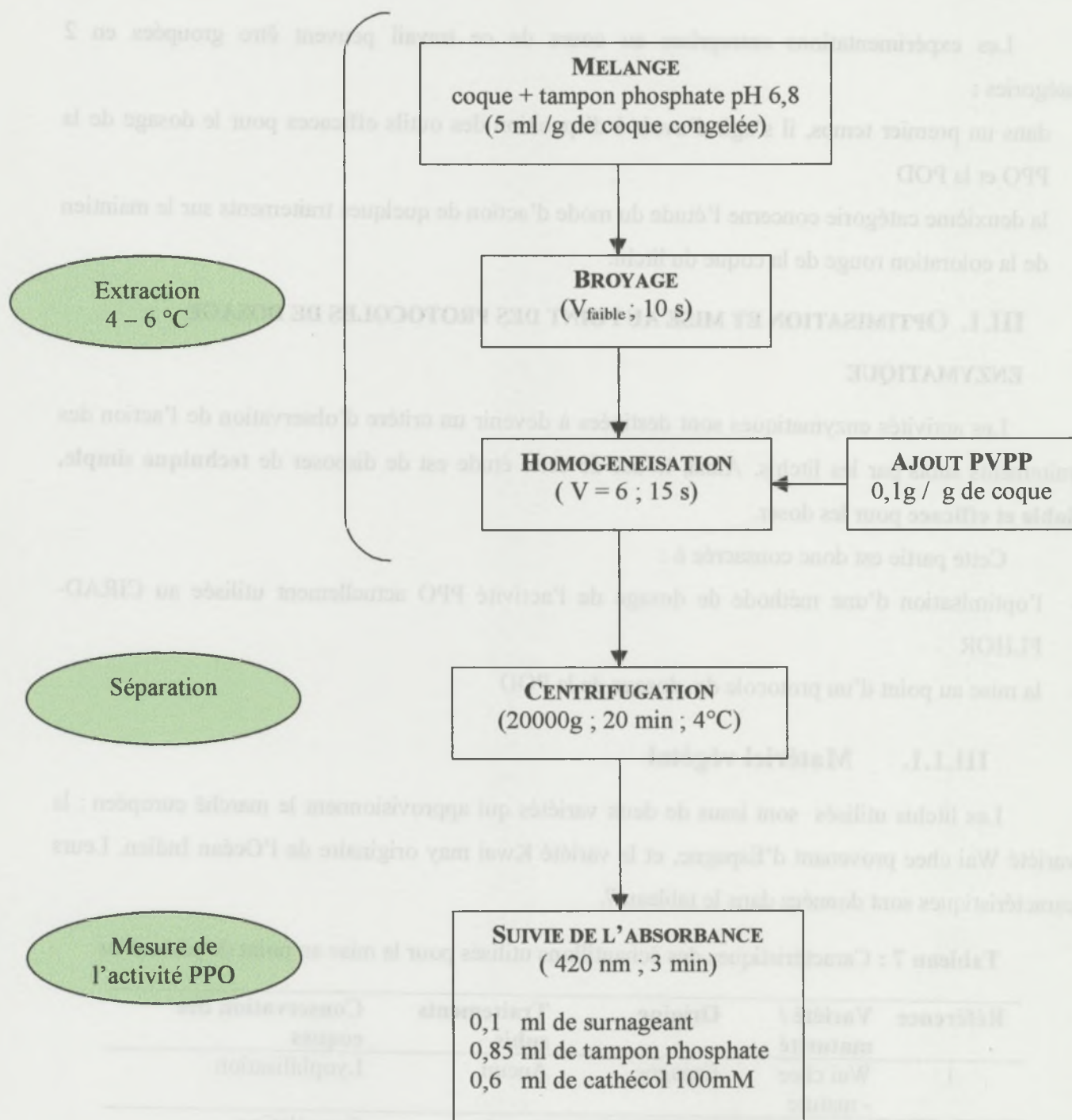


Figure 6 : Schéma de principe du protocole de base utilisé pour le dosage de la PPO

Les coques sont broyées avec un mixer (Waring Commercial, Laboratory Blender, Etats-Unis), à vitesse faible pendant 10 s. Les coques congelées sont laissées à décongeler pendant 10 min à température ambiante avant le broyage.

Dans 50 ml de tampon phosphate pH=6.8, on ajoute 10 g de coque congelée ou 3g de péricarpe lyophilisé que l'on continue à broyer avec un homogénéisateur Ultra turrax T25 Basic (Ika Labortechnik, Allemagne). 1 g de PVPP (Sigma) est ajouté avant la fin de l'homogénéisation. La solution est centrifugée pendant 20 min à 20000 g à 4°C. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique sur lequel va être mesurée l'activité enzymatique. La réaction enzymatique est menée à température ambiante dans des cuves de 1,5 ml. La solution d'enzyme (0,1 ml), à laquelle on ajoute 0,850 ml de tampon phosphate (pH=6.8), est mélangée à 0,6 ml de catéchol fraîchement dissout dans du tampon (0,22 g dans 20ml)

Un spectrophotomètre UVIKON 933 (Kontron Instruments, Italie) est utilisé pour suivre les variations d'absorbance à 420nm pendant 3 min. L'activité polyphenoloxydase est exprimée en absorbance à 420 nm/min/g de matière sèche.

La vitesse initiale est déterminée en début de réaction enzymatique. Une régression polynomiale de second ordre est appliquée à la cinétique enzymatique entre 0,2 et 1 min (Absorbance à 420 nm = $at^2 + bt + c$ avec a, b et c qui sont des constantes et t le temps). La vitesse initiale est alors le coefficient b, qui est la pente à l'origine de cette fonction de régression.

La figure 6 reprend le schéma de principe de la méthode de base utilisée pour le dosage de la PPO.

Figure 6 : Schéma de principe du protocole de base utilisée pour le dosage de la PPO

III.1.2.2. Essai de criblage des paramètres opératoires susceptibles d'affecter les résultats

Des paramètres du protocole sont susceptibles d'influencer la répétabilité de la mesure de l'activité PPO. Ainsi, il conviendrait de les standardiser.

a. Echantillonnage

➤ Assurer l'homogénéité des prises d'essai

Les coques des litchis sont sélectionnées pour leur intégrité (pas de blessure apparente). Broyer 20g de coque lyophilisée (ou 40g de coque congelée), bien homogénéiser avant d'effectuer les prises d'essai.

Les coques sont broyées avec un mixer (Waring Commercial, Laboratory Blender, Etats-Unis), à vitesse faible pendant 10 s. Les coques congelées sont laissées à décongeler pendant 10 min à température ambiante avant le broyage.

Dans 50 ml de tampon phosphate pH=6.8, on ajoute 10 g de coque congelée ou 3g de péricarpe lyophilisé que l'on continue à broyer avec un homogénéisateur Ultra turrax T25 Basic (Ika Labortechnik, Allemagne). 1 g de PVPP (Sigma) est ajouté avant la fin de l'homogénéisation. La solution est centrifugée pendant 20 min à 20000 g à 4°C. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique sur lequel va être mesurée l'activité enzymatique. La réaction enzymatique est menée à température ambiante dans des cuves de 1,5 ml. La solution d'enzyme (0,1 ml), à laquelle on ajoute 0,850 ml de tampon phosphate (pH=6.8), est mélangée à 0,6 ml de catéchol fraîchement dissout dans du tampon (0,22 g dans 20ml)

Un spectrophotomètre UVIKON 933 (Kontron Instruments, Italie) est utilisé pour suivre les variations d'absorbance à 420nm pendant 3 min. L'activité polyphenoloxydase est exprimée en absorbance à 420 nm/min/g de matière sèche.

La vitesse initiale est déterminée en début de réaction enzymatique. Une régression polynomiale de second ordre est appliquée à la cinétique enzymatique entre 0,2 et 1 min ($\text{Absorbance à } 420 \text{ nm} = at^2 + bt + c$ avec a, b et c qui sont des constantes et t le temps). La vitesse initiale est alors le coefficient b, qui est la pente à l'origine de cette fonction de régression.

La figure 6 reprend le schéma de principe de la méthode de base utilisée pour le dosage de la PPO.

Figure 6 : Schéma de principe du protocole de base utilisée pour le dosage de la PPO

III.1.2.2. Essai de criblage des paramètres opératoires susceptibles d'affecter les résultats

Des paramètres du protocole sont susceptibles d'influencer la répétabilité de la mesure de l'activité PPO. Ainsi, il conviendrait de les standardiser.

a. Echantillonnage

➤ Assurer l'homogénéité des prises d'essai

Les coques des litchis sont sélectionnées pour leur intégrité (pas de blessure apparente). Broyer 20g de coque lyophilisée (ou 40g de coque congelée), bien homogénéiser avant d'effectuer les prises d'essai.

b. Température d'extraction

- Assurer l'intégrité de l'activité PPO durant l'extraction

Pour tous les auteurs : 4°C afin de conserver l'intégrité de l'activité enzymatique.

c. Solution d'extraction : pH et quantité

- pH

- Consensus entre le pH optimal de stabilité et le pH optimal d'activité

pH optimal de stabilité : 7,4 (JIANG *et al.*, 1997)

pH optimal d'activité (avec 4-méthyl catéchol) :

- 7,0 (JIANG *et al.*, 1997)
- 6,8 (JIANG, 2001)

Généralement, le tampon phosphate utilisé lors de l'extraction et la mesure de l'activité est le même. Comme le pH optimal d'activité assure une bonne stabilité, on prend fréquemment pH = 6,8

- Quantité

- Quantité suffisante pour assurer une bonne séparation du surnageant lors de la centrifugation

La proportion proposée par le protocole de base nous semble acceptable.

d. Broyage : vitesse et durée

- Assurer la libération des enzymes qui sont membranaires, tout en évitant l'échauffement du matériel végétal.

Le matériel de broyage est préalablement refroidi à -20°C. L'utilisation du Warring Blender à vitesse faible pendant 10s réduit la taille des coques, mais le broyage proprement dit est assuré durant l'homogénéisation.

e. Homogénéisation : vitesse et durée

- Parfaire le broyage, et assurer le mélange avec le PVPP

Durant l'homogénéisation à l'ultra turrax 15s (vitesse 1 à 6 et 5s à vitesse 6) le mélange d'extraction baigne dans un bac de glace et d'eau.

f. Quantité de PVPP (Polyvinyl polypyrrolidone)

- La PVPP fixe les composés phénoliques. Ainsi la PPO se retrouve dans le surnageant, tandis que ses substrats potentiels (polyphénols) sont précipités dans le culot.

Les proportions varient beaucoup selon les auteurs.

g. Centrifugation : (vitesse, durée, température)

- Assurer une bonne séparation de l'extrait enzymatique surnageant.

La vitesse et la durée varient selon les auteurs. Le protocole de base propose (20000g ; 20min). La centrifugeuse qu'on avait à disposition ne pouvait aller au delà de 4800 rpm. Pour les expérimentations qui suivent, les paramètres de centrifugation sont (4800 rpm, 20 min, 4°C). Ainsi, une filtration (millipore 0,45µm) du surnageant est envisagée pour avoir un extrait aqueux de limpidité acceptable.

h. Milieu réactionnel : température et caractéristique du substrat

Température

- Température optimale de l'activité PPO, tout en assurant une facilité de mise en œuvre

La température optimale d'activité de la PPO est de :

- 70°C (JIANG *et al.*, 1997)
- 65°C (JIANG, 2001)

La détection de l'activité PPO est bonne à partir de 20°C. Ainsi, dans la littérature, la mesure se fait souvent à température ambiante.

Pour les expérimentations qui suivent, la température est fixée à 25°C par un bain-marie.

Substrat : type (longueur d'onde d'absorption), concentration

- bonne affinité avec la PPO
- concentration pour une activité optimale, sans inhibition par excès de substrat

On utilise généralement le 4-méthyl catéchol. Cependant, le catéchol a plus d'affinité avec la PPO de la coque de litchi. Si l'affinité avec le 4-méthyl catéchol est estimé à 100 %, pour le catéchol elle est de 167% (JIANG *et al.*, 1997), et même 171% (JIANG, 2001)

Selon les auteurs, le catéchol absorbe entre 390-410nm

- 395 nm (MARECHAUX, 2000)
- 400 nm (JIANG *et al.*, 1997; JIANG, 2001)

L'activité PPO est suivie à 400 nm.

i. Quantité de l'extrait enzymatique

- seuil de détection et bonne répétabilité des mesures

Tableau 8 : Récapitulatif de la démarche d'optimisation du protocole de dosage de la PPO

Paramètre		Impact sur les résultats	Recommandations		Optimisation	Valeurs retenues ou testées
			Méthode de base	Littérature		
Température d'extraction		Intégrité de l'activité enzymatique	4 – 6°C	4°C	NON	-
Solution d'extraction	pH	Intégrité de l'activité enzymatique	6,8	6,6 6,8	NON	-
	Quantité	Rendement d'extraction	5 ml / g coque	2,5 à 5 ml / g de coque	NON	-
Broyage (V ; t)		Rendement d'extraction	V fiable, 10 s	-	NON	-
Homogénéisation (V ; t)		Rendement d'extraction	V = 6 , 10 s	-	NON	-
Quantité PVPP (g/g de coque)		Intégrité de l'activité enzymatique	0,1	0,08 à 0,4	OUI	0,1 0,2 0,3
Centrifugation		Rendement d'extraction	20000 g 20 min ; 4°C	8000 g à 20000 g 10 à 20 min ; 4°C	NON	4800 rpm 20 min ; 4°C
Milieu réactionnel	θ	Optimisation de l'activité enzymatique exprimée	-	25°C	NON	25°C
	Type de substrat	Optimisation de l'activité enzymatique exprimée	catéchol	4-méthylcatéchol	NON	catéchol
Quantité de substrat		Optimisation de l'activité enzymatique exprimée	0,22g / 20 ml soit 40 mM final	23 mM à 25 mM	OUI	0 à 0,7 g / 20 ml
Quantité d'extrait enzymatique		Répétabilité des mesures	100 μ l	-	OUI	50 μ l à 400 μ l

j. Expression de l'activité enzymatique

Pour la mise au point des protocoles, l'activité enzymatique est assimilée à la vitesse initiale, et est exprimée en $\Delta A/\text{min}$.

Pour les dosages proprement dits, l'activité enzymatique est rapportée à la matière sèche. Bien que la concentration en protéine soit adoptée par plusieurs auteurs, elle n'a pas été retenue pour notre étude car :

- la concentration en protéines des extraits enzymatiques est très faible (JIANG, 1997 ; MARECHAUX, 2000), ce qui implique une limite de sensibilité pour leur dosage.
- la méthode de Bradford, la plus communément utilisée ne serait pas adaptée. Effectivement, il s'est avéré qu'il existe une interaction positive entre les polyphénols de l'extrait et le réactif de Bradford, entraînant une surestimation des protéines (MARECHAUX, 2000).

La matière organique totale (MOT) a été utilisée par MARECHAUX (2000) et MAIRE (2002) pour la rapidité de son dosage, et l'économie d'extrait brut. Cependant, la MOT n'a pas été citée dans la littérature, et l'étendue de notre étude sur 2 variétés différentes nous a poussé à adopter la matière sèche (MS) comme référence de l'activité enzymatique.

III.1.2.3. Optimisation des facteurs retenus

Le récapitulatif du criblage effectué est donné sur dans le tableau 8.

Tableau 8 : Récapitulatif du choix des paramètres à optimiser pour le dosage de la PPO

Certains paramètres opératoires ont donc pu être fixés et ils sont adoptés pour la suite des expérimentations. L'optimisation des paramètres restant est effectué selon les conditions opératoires définies dans le tableau 9.

Tableau 9 : Conditions opératoires de l'optimisation du dosage de la PPO

Paramètres à optimiser	Conditions opératoires		
	C _s (g / 20ml)	Enz (μl)	PVPP (g/g de coque)
C _s : Concentration en substrat	0 à 0,7	100*	0,1*
Enz : Quantité d'enzyme	C _s optimisé	50 à 400	0,1*
PVPP : Quantité de PVPP	C _s optimisé	Enz optimisé	0,1 à 0,3

* : valeur du protocole de base

a. Concentration en substrat (catéchol)

L'étude de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat permet d'établir la courbe de saturation de l'enzyme, donc de déterminer les paramètres de la cinétique. Km est spécifique à l'enzyme, et ne dépend pas des conditions opératoires.

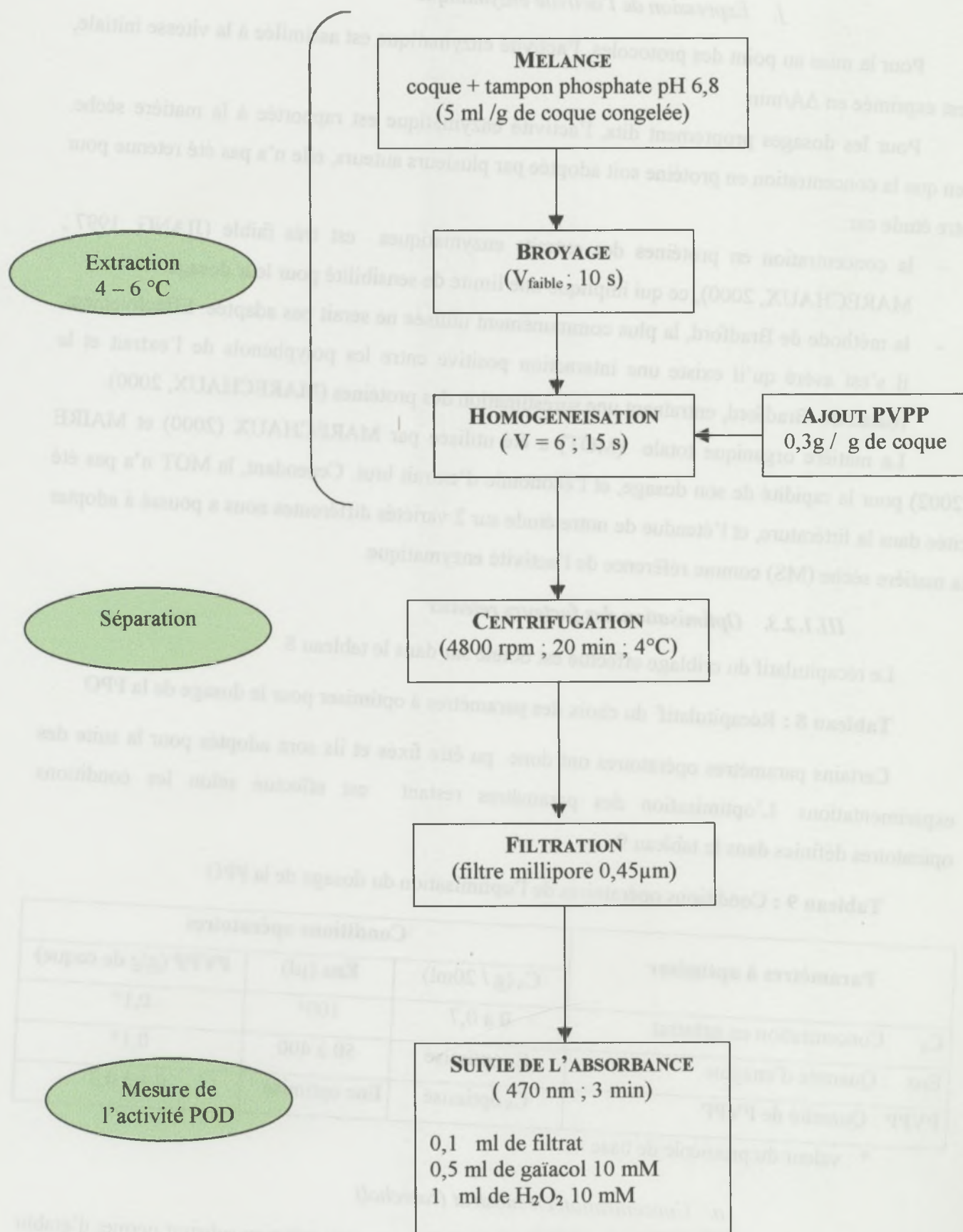


Figure 7 : Schéma de principe du protocole de base utilisé pour le dosage de la POD

Les concentrations utilisées étaient de 0 à 0,7g de catéchol dans 20ml de tampon. Ces valeurs ont été choisies de manières :

- à s'assurer que l'extrait enzymatique obtenu ne contient pas de polyphenols endogènes, pouvant interférer dans la mesure de l'activité ; d'où la mesure à blanc (sans catéchol)
- à ce que la gamme choisie permette l'obtention de la cinétique hyperbolique complète (observation de la saturation)

b. Quantité d'extrait enzymatique

Le dosage enzymatique est fondé sur le fait que l'activité est linéairement proportionnelle à la concentration en enzyme. Cette linéarité n'est obtenue que dans une gamme de concentration, qu'il convient de déterminer.

Ainsi, on a ajouté 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l d'extrait enzymatique au mélange réactionnel

c. Quantité de PVPP

L'insuffisance de PVPP pourrait laisser des composés phénoliques libres qui sont susceptibles d'agir avec l'enzyme à doser.

Lors de l'extraction de la PPO, il a été utilisé 1 g, 2 g et 3 g de PVPP pour 10 g de coque congelée.

III.1.3. Mise au point d'un protocole de dosage de la POD

Dans le cas du litchi, aucun article à disposition ne détaillait le protocole de dosage de la POD. LE ROUX (1999) a dosé l'activité POD de la coque de litchi dans le cadre d'une détermination des caractéristiques de l'enzyme. L'adoption d'une purification supplémentaire de l'extrait brut rend difficile la mise en œuvre de cette méthode.

Le protocole d'extraction de la PPO a été adopté pour la POD, conformément à la littérature (ZAUBERMAN *et al.*, 1991 ; ZHANG et QUANTICK, 1997 ; LE ROUX, 1999).

La mesure proprement dite de l'activité POD est adaptée d'un protocole simple communément utilisé pour le dosage de la peroxydase de radis. Plusieurs essais préliminaires ont été menés avant de pouvoir définir un protocole de base (Fig 7)

Figure 7 : Schéma de principe du protocole de base utilisée pour le dosage de la POD

III.1.3.1. Méthode de base utilisée pour le dosage de la POD

Les extraits aqueux de coque de litchi sont préparés comme suit. Le matériel d'extraction est préalablement refroidi à 20°C et les réactifs et solutions d'extraction à 4°C. L'extraction est conduite à 4-6°C dans un bac d'eau glacée.

Les coques sont broyées avec un mixer (Waring Commercial, Laboratory Blender, Etats Unis), à vitesse faible pendant 10 s. Les coques congelées sont laissées à décongeler pendant 10min à température ambiante avant le broyage.

Dans 50ml de tampon phosphate pH=6.8, on ajoute 10 g de coque congelée ou 3 g de péricarpe lyophilisé que l'on continue à broyer avec un homogénéisateur Ultra turrax T 25 Basic, (Ika Labortechnik, Allemagne). 3 g de PVPP (Sigma) sont ajoutés avant la fin de l'homogénéisation. La solution est centrifugée pendant 20 min à 4800 rpm dans une centrifugeuse CR 4.12 (Jouan, Etats-Unis) à 4°C. Le surnageant est ensuite passé à travers un filtre millipore 0,45 µm. Le filtrat constitue l'extrait enzymatique sur lequel on va effectuer la mesure de l'activité.

La réaction enzymatique est menée à température ambiante dans des cuves de 1,5 ml. La solution d'enzyme (0,1 ml) est mélangée avec 0,5 ml de gaïacol 10 mM. La réaction est démarrée par addition de 1 ml de H₂O₂ à 10 mM.

Un spectrophotomètre UVIKON 933 (Kontron Instruments, Italie) est utilisé pour suivre les variations d'absorbance à 470 nm pendant 3 min. L'activité peroxydase est exprimée en absorbance à 470 nm/min/g de matière sèche.

III.1.3.2. Optimisation de la méthode

L'optimisation a été conduite de la même façon que pour la PPO (Tab 10). La variation ne concerne qu'un seul facteur, et chaque valeur optimisée est intégrée pour la suite des expérimentations. Les gammes de valeurs retenues sont issues d'études préliminaires. Pour les substrats, il s'agit d'obtenir une courbe de saturation complète. Concernant la quantité d'enzymes, l'objectif est d'être dans le domaine de linéarité.

Tableau 10 : Conditions opératoires de l'optimisation du dosage de la PPO

Paramètres à optimiser	Conditions opératoires		
	C _H (mM)	C _G (mM)	Enz (µl)
C _H : Concentration en H ₂ O ₂	5 à 25	10*	0,1*
C _G : concentration en gaïacol	C _H optimisé	1 à 15	0,1*
Enz : Quantité d'enzyme	C _H optimisé	C _G optimisé	50 à 400

* : valeur du protocole de base

a. Concentration optimale en H_2O_2

Les concentrations choisies sont : 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM

Cette optimisation a été conduite sur les deux échantillons pour pouvoir confirmer les résultats, vu qu'il n'y avait pas d'étude antérieure à disposition.

b. Concentration optimale en gaïacol

On a utilisé les concentrations suivantes : 1 mM, 2 mM, 5 mM, 9 mM, 15 mM

c. Quantité optimale d'extrait enzymatique

Il a été ajouté 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l d'extrait enzymatique au mélange réactionnel.

III.1.4. Compléments

III.1.4.1. Répétabilité des méthodes

Avant toute application, il est indispensable de tester la fiabilité des méthodes mises au point.

Dans cette optique, la répétabilité a été étudiée sur 2 niveaux :

- il y a tout d'abord *la répétabilité des mesures* spectrophotométriques réalisées sur une même extraction. Pour chaque extraction, 5 mesures ont été effectuées. A partir de la valeur moyenne et de l'écart-type, on calcule le coefficient de variation qui est acceptable en dessous de 15%.

Cette répétition a été effectuée systématiquement avec 3 répétitions pour toutes les autres mesures d'activité. Les barres d'erreurs des graphiques représentent l'écart-type de ces mesures.

- ensuite, il y a la répétabilité des mesures d'activités sur plusieurs extractions issues du même échantillon. Il s'agit au fait de la *répétabilité de l'extraction* qui peut être considérée comme un test de la reproductibilité de la méthode. A partir d'un même échantillon, on a effectué 5 extractions.

III.1.4.2. Etude de la stabilité des activités enzymatiques

La mesure des activités enzymatiques est effectuée sur des extraits aqueux dont on ignore la stabilité. Dans la pratique, est-il possible de regrouper les extractions, de conserver les extraits à 4°C et de faire les mesures d'activité plus tard. L'activité PPO et POD des extraits a été suivie durant 5 jours soit J (le jour de l'extraction), (J+1), (J+2), (J+3), (J+4)

III.1.5. Traitements des données

III.1.5.1. Etude des cinétiques

La détermination des constantes cinétiques des enzymes est effectuée avec la méthode de Michaelis-Menten. Elles sont déterminées avec une régression de type $y = a \cdot x / (b+x)$ sur le logiciel Curve Expert où a représente V_m (la vitesse maximale) et b le K_m

Une représentation de Lineweaver- Burk sera utilisée pour confirmer les résultats.

III.1.5.2. Traitement statistique

Les analyses statistiques sont effectuées sur EXCELL et sur le logiciel STATISTICA.

III.2. ETUDE DU MODE D'ACTION DES TRAITEMENTS

Le brunissement de la coque de litchi est habituellement attribué à des activités enzymatiques. Ainsi, leur effet est évaluée sur les activités PPO et POD, et sur les anthocyanes qui responsables de la coloration rouge

III.2.1. Matériel végétal

Les fruits de litchi utilisés sont issus de deux variétés et de diverses provenances. Ils ont subis ou non différents types de traitement.

Tableau 11 : Caractéristique des échantillons utilisés pour l'étude du mode d'action de quelques traitements

Réf	Variété / maturité	Origine	Type de traitement	Jour de prélèvement des coques	Conservation des coques
Wt	Wai chee - matures	Espagne	aucun	J+2	lyophilisation
Wa	Wai chee - matures	Espagne	acide	J+21	lyophilisation
Wf	Wai chee - matures	Espagne	filmage	J+9	Congélation
KTf	Kwai may - matures	Réunion	aucun (témoin film)	J+3	Congélation
Kf	Kwai may - matures	Réunion	filmage	J+9	Congélation
KTa	Kwai may -mature	Madagascar	aucun (témoin acide)	J+1	Congélation
Ka	Kwai may - matures	Madagascar	acide	J+20	Congélation

J : jour de récolte

III.2.2. Les traitements

III.2.2.1. *Traitement de trempage*

Le traitement de trempage consiste à immerger les fruits dans des solutions préparées comme suit : l'acide citrique (Fluka, Suisse) est dissout dans de l'eau, à chaud, à une concentration 600g/l. En cours de dissolution de l'acide citrique, on ajoute du chitosane (Fluka, Suisse) de poids moléculaire moyen à 0,75%. La solution de trempage est laissée à refroidir à température ambiante. Les litchis sont trempés 20 s dans la solution de trempage, égouttés, séchés à l'air et mis au froid (4°C)

III.2.2.2. *Utilisation d'atmosphère modifiée*

Les fruits sont conditionnés dans des barquettes plastiques d'environ 500g. Chaque barquette est par la suite emballée dans un film plastique de perméance 30000cc/m².24h (Compagnie Franco suisse, France) et conservée sous froid (4°C)

III.2.3. Les techniques d'analyse

III.2.3.1. *Dosage des anthocyanes*

a. Lyophilisation des coques de litchi

5 g de coque échantillonnés sur 8 à 10 coques congelées sont découpés en morceaux de diamètre apparent inférieur à 5 mm. Les coques sont ensuite congelées à -50°C pour lyophilisation. La lyophilisation est réalisée pendant 48 h dans un lyophilisateur (Usifroid, France). Les coques lyophilisées sont conservées sous vide dans un dessiccateur à température ambiante. Les poudres de coques sont obtenues après broyage des coques lyophilisées au broyeur mécanique (Waring Commercial, Laboratory Blender, Etats Unis) pendant 30 s.

b. Extraction des anthocyanes

La solution d'extraction est constituée d'un mélange de méthanol avec du HCl 37% (Merck, Allemagne) à 2,5% (v/v) (LE ROUX, 1999). Le mélange d'1g de poudre de coques de litchi lyophilisées (ou 2 g de coques congelées broyées) avec 20 ml de solution d'extraction est mis sous agitation magnétique (1200 rpm ; 20 min), le surnageant est ensuite filtré sur entonnoir à verre fritté de porosité n°1. Le mélange de la fraction solide avec 20 ml de solution d'extraction est mis sous agitation magnétique (1200rpm ; 5 min), puis le surnageant est filtré sur l'entonnoir.

L'extrait filtré est ensuite séché sous vide à 30°C pendant 30 min dans un évaporateur Rotary Vacuum Evaporator RE 100 (Bibby Sterilin LTD, Royaume-Uni)

L'extrait sec est solubilisé dans 2 ml de méthanol. L'extrait obtenu filtré avec un filtre de porosité 0,45 μm (Filtre Millex de 25 mm de diamètre, à membrane PTFE hydrophilisée ; Millipore, France) est conservé à -20°C dans un tube fermé hermétiquement. Pour l'analyse en CLHP, les extraits sont dilués 20 fois dans la solution d'extraction.

c. Chromatographie liquide haute pression (CLHP)

Les extraits dilués sont analysés sur un chromatographe SpectraSystem P1000XR (Thermo Separation Products, Etats Unis) équipé d'une boucle d'injection de 20 μl , d'un contrôleur automatique de gradient et d'un four à colonne, pilotés par le logiciel PC1000.

Les anthocyanes sont séparés sur une colonne Lichrospher 100RP18E de granulométrie 5 μm et de dimension 250 * 4,6 mm (Merk Eurolab S.A., France). La température du four à colonne est de 30°C . La phase mobile est un mélange d'eau avec de l'acide formique à 2% (v/v) et un gradient d'acétonitrile est utilisé comme décrit dans le tableau n°12. Le débit est de 1 mL/min. Les composés élués sont détectés par mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde de 450 à 600 nm. Leur dosage est réalisé en utilisant des droites étalon : 3-rutinoside de cyanidol et 3-glucoside de cyanidol (Extrasynthèse, France).

Le gradient de rinçage est décrit dans le tableau n°13 (dérivés de la méthode de LE ROUX, 1999)

Tableau 12 : Gradient utilisé pour l'analyse CLHP des anthocyanes de la coque de litchi

Temps (min)	% A	% B
0	97	3
4	97	3
52	65	35
57	20	80
61	20	80
62	97	3
70	97	3

A : eau, acide formique 2% (v/v) B : eau, acide formique 2% , acétonitrile à 80% (v/v)

Tableau 13: Gradient utilisé pour le rinçage après l'analyse CLHP des anthocyanes de la coque de litchi

Temps (min)	% A	% B
0	97	3
4	20	80
14	20	80
18	97	3
22	97	3

A : eau, acide formique à 2% (v/v)

B : eau, acide formique à 2%, acétonitrile à 80% (v/v)

III.2.3.2. Dosage de l'activité PPO*

Les extraits aqueux de coque de litchi sont préparés comme suit. Le matériel d'extraction est préalablement refroidi à 20°C et les réactifs et solutions d'extraction à 4°C. L'extraction est conduite à 4-6°C dans un bac d'eau glacée.

Les coques sont broyées avec un mixer (Waring Commercial, Laboratory Blender, Etats Unis), à vitesse faible pendant 10s. Les coques congelées sont laissées à décongeler pendant 10 min à température ambiante avant le broyage.

Dans 50ml de tampon phosphate pH=6.8, on ajoute 10 g de coque congelée ou 3 g de péricarpe lyophilisé que l'on continue à broyer avec un homogénéisateur Ultra turrax T 25 Basic (Ika Labortechnik, Allemagne). 3 g de PVPP (Sigma) sont ajoutés avant la fin de l'homogénéisation. La solution est centrifugée pendant 20 min à 4800 rpm dans une centrifugeuse CR 4.12 (Jouan, Etats-Unis) à 4°C. Le surnageant est ensuite passé à travers un filtre millipore (0,45µm). Le filtrat constitue l'extrait enzymatique sur lequel on va effectuer la mesure de l'activité.

La réaction enzymatique est menée à température ambiante dans des cuves de 1,5 ml. La solution d'enzyme (0,2 ml), à laquelle on ajoute 0,85 ml de tampon phosphate (pH=6.8), est mélangée avec 0,6 ml de catéchol fraîchement dissout dans du tampon (0,22 g dans 20 ml soit 100mM)

Un spectrophotomètre UVIKON 933 (Kontron Instruments, Italie) est utilisé pour suivre les variations d'absorbance à 400 nm pendant 3 min. L'activité polyphenoloxydase est exprimée en absorbance à 400 nm/min/g de matière sèche.

III.2.3.3. Dosage de l'activité POD**

Les extraits aqueux de coque de litchi sont préparés comme suit. Le matériel d'extraction est préalablement refroidi à 20°C et les réactifs et solutions d'extraction à 4°C. L'extraction est conduite à 4-6°C dans un bac d'eau glacée.

Les coques sont broyées avec un mixer (Waring Commercial, Laboratory Blender, Etats Unis), à vitesse faible pendant 10 s. Les coques congelées sont laissées à décongeler pendant 10 min à température ambiante avant le broyage.

* protocole issu de l'optimisation (§ IV.1.1)

** Protocole issu de la mise au point (§ IV.1.2)

Dans 50 ml de tampon phosphate pH=6.8, on ajoute 10 g de coque congelée ou 3 g de péricarpe lyophilisé que l'on continue à broyer avec un homogénéisateur Ultra turrax T 25 Basic (Ika Labortechnik, Allemagne). 3 g de PVPP (Sigma) sont ajoutés avant la fin de l'homogénéisation. La solution est centrifugée pendant 20 min à 4800 rpm dans une centrifugeuse CR 4.12 (Jouan, Etats-Unis) à 4°C. Le surnageant est ensuite passé à travers un filtre millipore 0,45 µm. Le filtrat constitue l'extrait enzymatique sur lequel on va effectuer la mesure de l'activité.

La réaction enzymatique est menée à température ambiante dans des cuves de 1,5 ml. La solution d'enzyme (0,1 ml) est mélangée avec 0,5 ml de gaïacol 10 mM. La réaction est démarrée par addition de 1 ml de H₂O₂ à 10 mM.

Un spectrophotomètre UVIKON 933 (Kontron Instruments, Italie) est utilisé pour suivre les variations d'absorbance à 470 nm pendant 3 min. L'activité peroxydase est exprimée en absorbance à 470 nm/min/g de matière sèche.

III.2.3.4. Mesure du taux de matière sèche des coques

La matière sèche des coques est dosée par étuvage. Un échantillon de 8 à 10 litchis est pelé. 2 à 5 g de coques sont présechés dans une étuve ULM 500 (Mettler, Allemagne) à 70°C pendant 24 h, puis séchés dans une étuve à vide 45003 (Bioblock Scientific, Etats-Unis) : -30 cm de Hg, 70°C, 24 à 48h ; jusqu'à stabilisation de la masse à 1 mg près. Le taux de matière sèche est exprimée en pourcentage par rapport à la masse de matière fraîche.

III.2.3.5. Mesure de la couleur

La mesure de la couleur des coques est réalisée avec un chromamètre Chromameter CR 300 (Minolta, Japon). Le codage utilisé est le système L*a*b avec :

L : indice de luminance variant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc

a : indice vert-rouge variant de -60 pour le vert à 60 pour le rouge

b : indice bleu-jaune variant de -60 pour le blanc à 60 pour le jaune.

Les coques sont broyées au Waring Commercial (Laboratory Blender, Etats-Unis). 15 mesures sont effectuées sur la poudre obtenue. Seul le paramètre a , représentatif de la couleur rouge est considéré pour le cas du litchi.

III.2.3.6. Mesure de pH

Le pH des coques est mesuré avec un pH-mètre CG 842 (SCHOTT, Etats Unis ; électrode Blue Line 14pH). Environ 2g coques sont broyées au Waring Commercial (Laboratory Blender, Etats Unis). 20 ml d'eau distillé est ajoutée pour la mesure.

III.2.3.7. Dosage de l'activité anthocyanase

La méthode utilisée est adaptée de celle de ZHANG *et al.* (2001)

L'activité anthocyanase du litchi est extrait en homogénéisant 4d de péricarpe avec 10 ml de tampon acétate de sodium (pH = 4.0) et de PVPP (10% en poids de la coque soit 0,4g). Le mélange est centrifugé pendant 20 min à 4800 rpm et 4°C. Ensuite le surnageant est collecté comme extrait enzymatique brut.

1 ml d'extrait enzymatique est ajouté à 4 ml de 3-glucoside de cyanidol 0,05mM (Extrasynthèse, France) dissout dans du tampon acétate de sodium (pH 4.0). Après que le mélange ait été incubé pendant 10min à 40°C, 5 ml de HCl 0,1M est ajouté.

L'absorbance est mesurée à 510 nm pendant 3min. L'activité anthocyanase est exprimée en $\Delta A_{510\text{ nm}}/\text{min/g MS}$.

IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. OPTIMISATION DES METHODES DE DOSAGE ENZYMATIQUE

IV.1.1. Optimisation du protocole de dosage de la PPO

IV.1.1.1. Concentration optimale en catéchol

La variation de la concentration en catéchol a donné la courbe qui suit (Fig 8). La détermination des constantes cinétiques est effectuée par la méthode de Michaelis-Menten (Fig 9) et celle de Lineweaver- Burk (Fig 10)

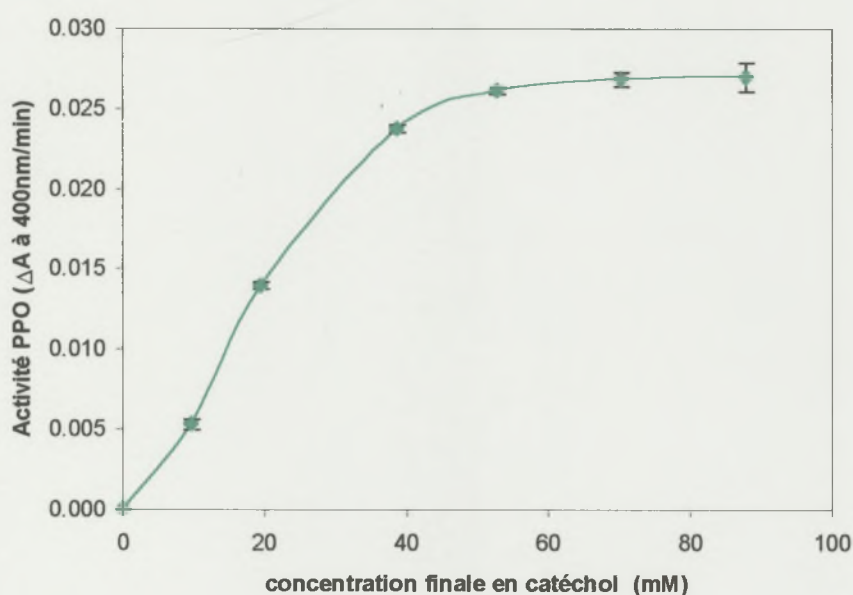


Figure 8 : Courbe d'activité de la PPO en fonction de la concentration en catéchol

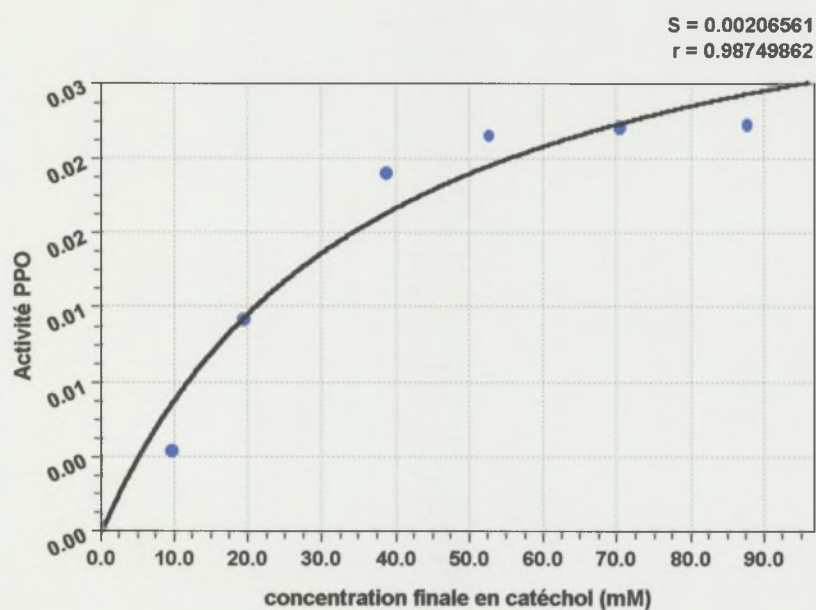


Figure 9 : Détermination de K_m et V_m de la PPO (Méthode de Michaelis-Menten)

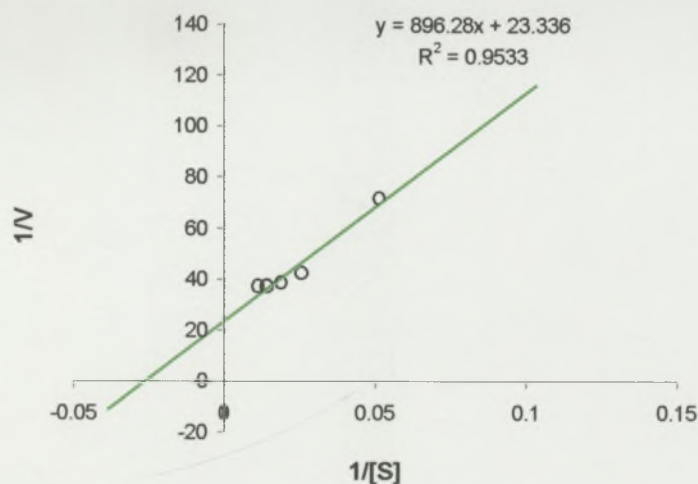


Figure 10 : Détermination de K_m et V_m de la PPO (Représentation de Lineweaver- Burk)

Le tableau 14 regroupe les résultats obtenus par les deux méthodes.

Tableau 14 : Détermination des constantes cinétiques de la PPO de litchi

Méthodes	Michaelis-Menten	Lineweaver- Burk
V_m ($\Delta A_{400nm}/min$)	0,041	0,042
K_m (mM)	36,80	38,40

Les valeurs de V_m obtenue coïncide avec les résultats obtenus par MARECHAUX (2000) et MAIRE (2002) pour l'étude de la cinétique de la PPO du péricarpe de litchi avec le catéchol ($K_m = 40mM$). Effectivement, un début d'inhibition par excès de substrat est perceptible pour une concentration en catéchol de $40mM$. Ainsi, cette concentration finale est retenue pour le dosage de PPO, soit une solution de concentration initiale $100mM$ ($0,22\text{ g} / 20ml$).

IV.1.1.2. Quantité d'extrait enzymatique

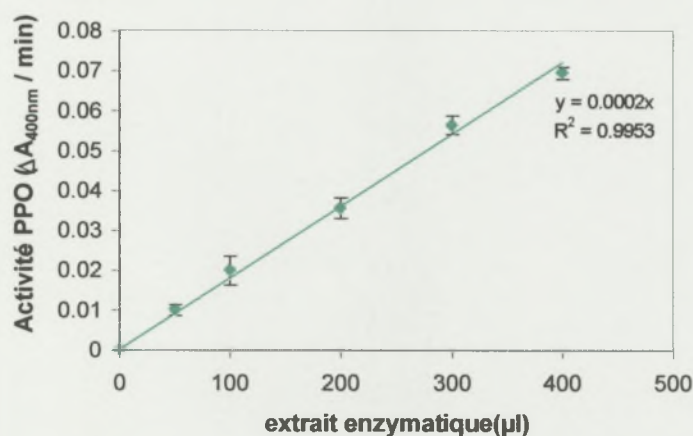


Figure 11 : Variation de l'activité PPO en fonction de la quantité d'enzyme

L'activité PPO est linéairement proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le mélange réactionnel. Ceci confirme le fondement du dosage enzymatique : en effet, la vitesse initiale d'une réaction enzymatique dans un milieu où la concentration de l'enzyme est inconnue est proportionnelle à cette concentration.

A partir de 50 μ l d'extrait enzymatique, l'activité est bien exprimée. Cependant, plus on augmente la quantité d'enzyme ajoutée, plus la répétabilité des mesures est fiable (diminution du coefficient de variation).

Le coefficient de variation (= écart type*100/moyenne) est acceptable à partir de 200 μ l.

IV.1.1.3. Quantité de PVPP

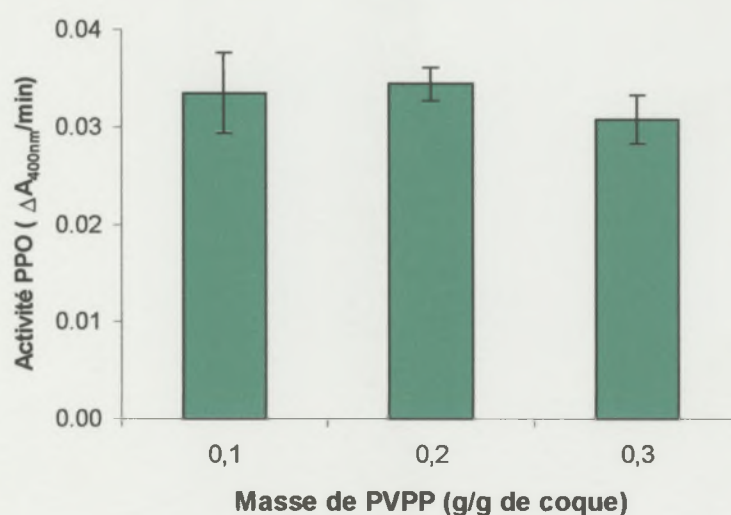


Figure 12 : Effet de la quantité de PVPP sur l'activité PPO

La différence entre l'activité PPO pour les 3 différentes quantités de PVPP n'est pas significative (Analyse de variance à 1 facteur). A partir de 0,1g / g de coque la proportion de PVPP est suffisante et ne constitue pas un facteur influent. Ceci confirme bien les choix de JIANG *et al.* (1997a et 2004b). Cependant, on remarque que plus on met de PVPP, plus l'extrait enzymatique est limpide (la centrifugation est plus efficace). Ainsi on ajoutera pour la suite des expérimentations 0,3g de PVPP/g de coque.

IV.1.2. Optimisation de la méthode de dosage de la POD

IV.1.2.1. Concentration optimale en substrat (H_2O_2)

L'étude de l'influence de la concentration en H_2O_2 a donné les courbes de saturation suivantes (Fig 14)

Echantillon 1 : (Wai chee)

Echantillon 2 : (Kwai may)

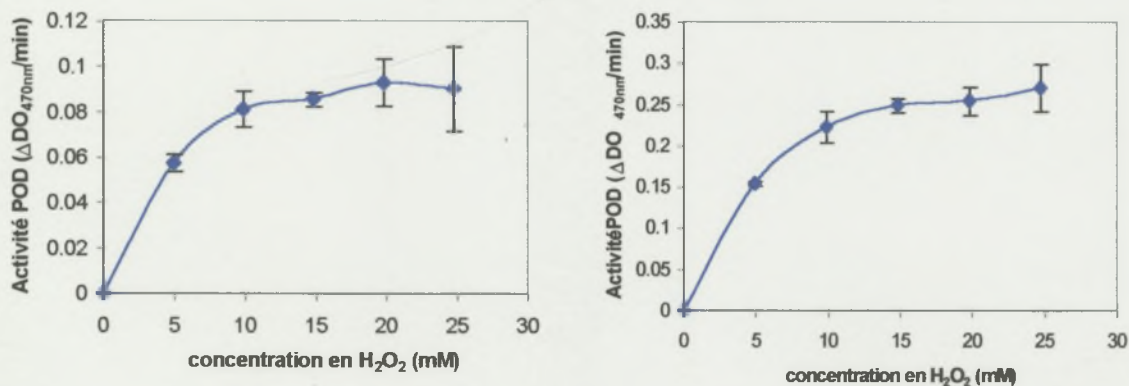


Figure 13 : Courbe d'activité POD en fonction de la concentration en H_2O_2

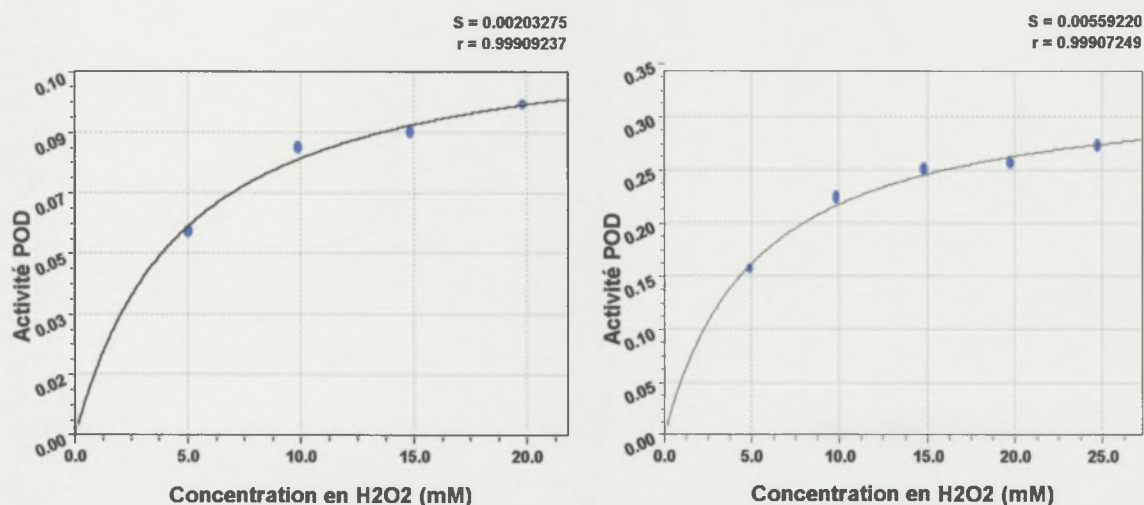


Figure 14 : Détermination de K_m et V_m de la POD (Méthode de Michaelis Menten)

$V_m = 0,12$
 $K_m = 4,78$

$V_m = 0,33$
 $K_m = 5,22$

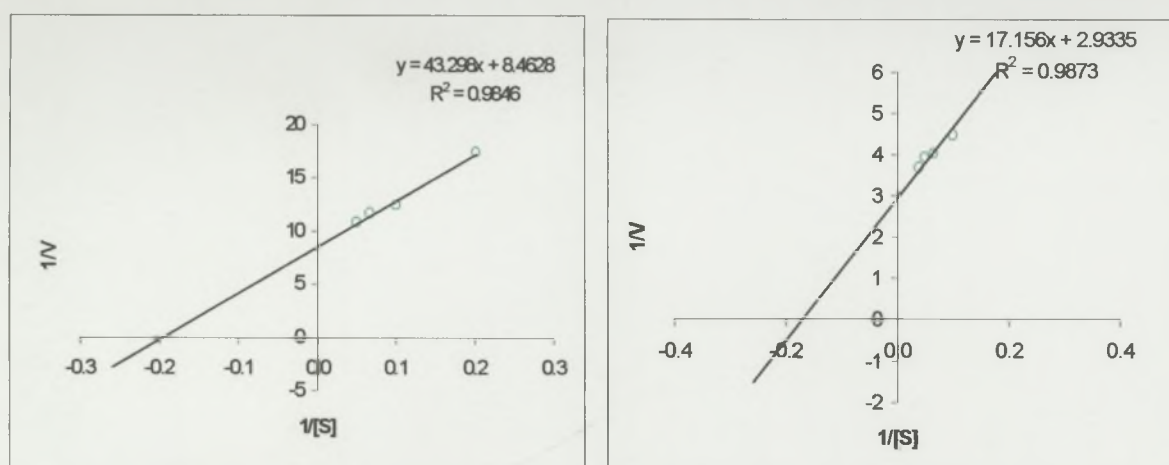


Figure 15 : Détermination de K_m et V_m de la POD (Représentation de Lineweaver- Burk)

$$V_m = 0,12$$

$$K_m = 5,11$$

$$V_m = 0,34$$

$$K_m = 5,44$$

Pour un même échantillon, les deux méthodes de détermination des constantes de cinétiques donnent des valeurs équivalentes. Pour les deux échantillons, les valeurs de K_m trouvées restent très proches, ce qui caractérise bien la POD du litchi.

La valeur de K_m est égale à $5,13 \pm 0,27$

Le début d'une inhibition par excès est observé à partir de la concentration de 10mM ; concentration qui sera adoptée pour le dosage.

IV.1.2.2. Concentration optimale en gaïacol

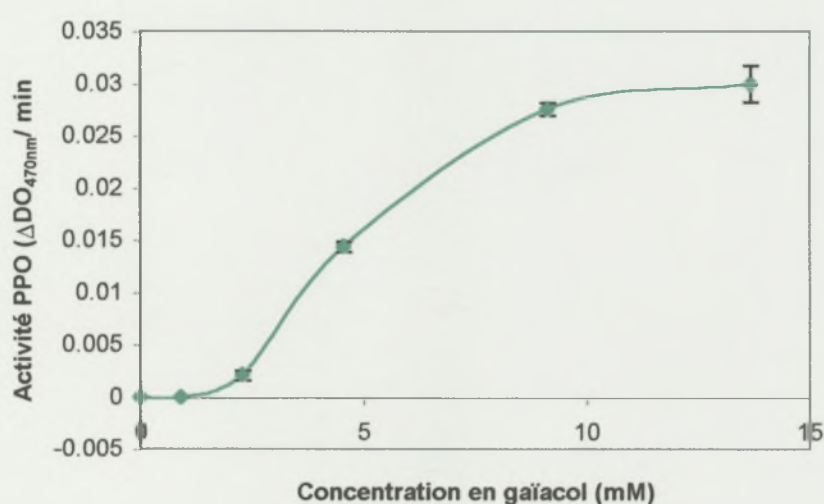


Figure 16 : Influence de la concentration en gaïacol sur l'activité POD

La concentration retenue est de 10 mM initiale.

IV.1.2.3. Quantité optimale d'extrait enzymatique

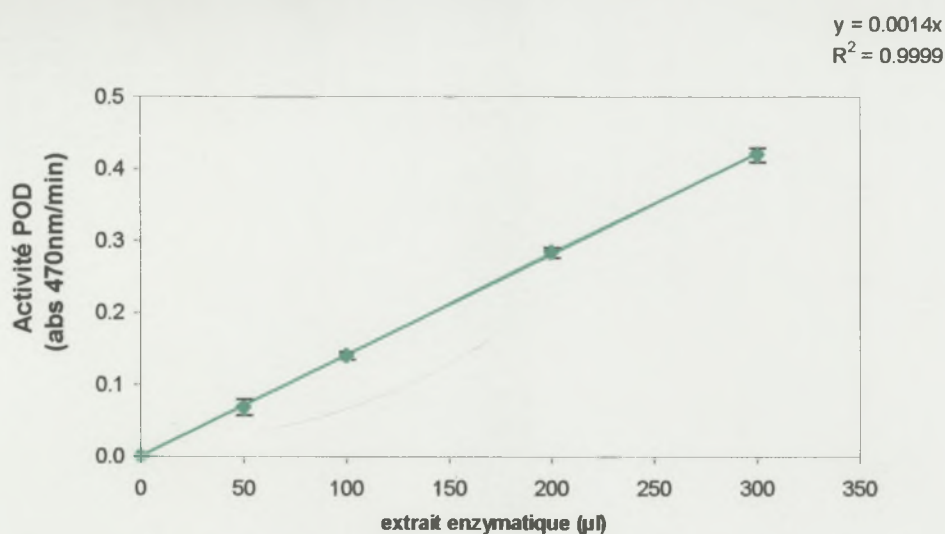


Figure 17 : Variation de l'activité POD en fonction de la quantité d'enzyme

La quantité d'enzyme retenue est de 100 µl.

IV.1.3. Stabilité des activités enzymatiques

IV.1.3.1. Stabilité de l'activité PPO

La figure 13 présente l'évolution de l'activité PPO au cours du temps.

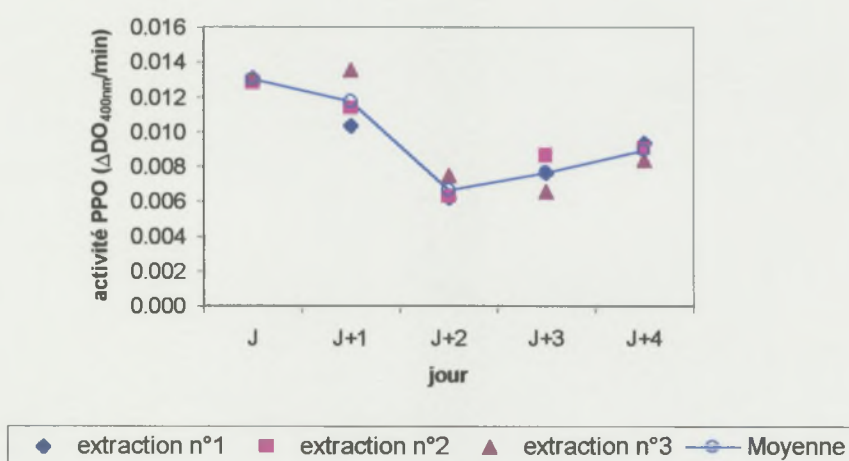


Figure 18 : Stabilité de l'activité PPO au cours du temps

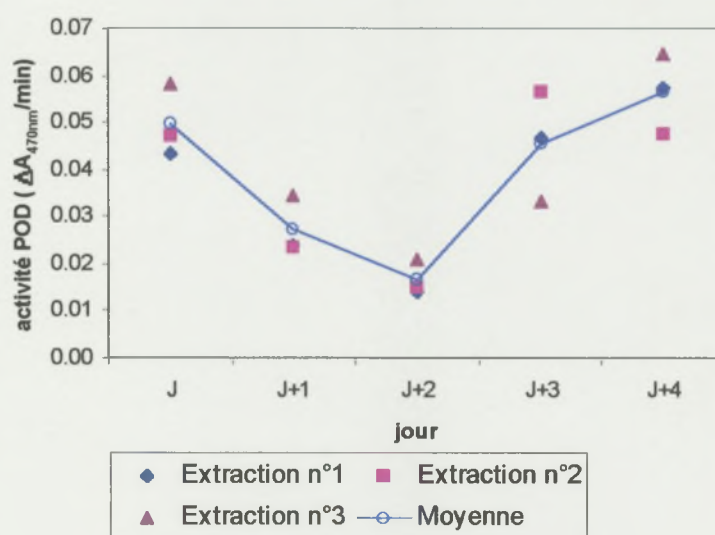
Les résultats obtenus montrent une instabilité de l'activité PPO dans les extraits conservés à 4°C (Fig 18). Contrairement aux observations de MARECHAUX (2000), les variations mesurées au cours du temps ne sont pas négligeables. Ces variations pourraient être imputées à d'éventuelles interactions entre les substances organiques en présence. MARECHAUX (2000) estime la concentration en matière organique dans l'extrait à environ 32 g / L.

Par ailleurs, bien que les activités PPO des 3 extractions suivent la même tendance au cours du temps, l'évolution de chacune d'elles semble aléatoire. Avec les résultats à disposition, il nous est impossible de modéliser cette cinétique de variation de l'activité. Donc, même dans un objectif uniquement comparatif entre échantillons, les résultats obtenus sur des extraits conservés à 4°C ne pourraient être qualifiés de fiables.

La congélation de l'extrait ne pourrait être envisagée car elle provoquerait une perte d'activité trop importante : environ 40% (MARECHAUX 2000).

L'explication de ces phénomènes de variation de l'activité PPO constitue une étude à part entière qui sort du cadre de ce travail. Ainsi nous préconisons d'effectuer le dosage spectrophotométrique de l'activité PPO dans les 2 heures qui suivent l'extraction (stabilité de l'activité selon MARECHAUX, 2000)

IV.1.3.2. Stabilité de l'activité POD



Il est observé le même phénomène que pour la stabilité de la PPO. Il est recommandé d'effectuer le dosage enzymatique dans les 2 heures qui suivent l'extraction.

IV.1.4. Répétabilité des méthodes

Les résultats des études de répétabilité sont acceptables pour les deux enzymes.

Activités	Répétabilité	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation
PPO (en $\Delta A_{400nm}/min$)	1	0,0113	0,0011	9,5%
	2	0,0130	0,0002	1,2%
POD (en $\Delta A_{470nm}/min$)	1	0,078	0,0052	6,6%
	2	0,0469	0,003	7%

1 : répétabilité de la mesure

2 : répétabilité de l'extraction

IV.2. ETUDE COMPARATIVE DE DEUX VARIETES : KWAI MAY ET WAI CHEE

Cette partie consiste à comparer les deux échantillons à étudier, en rapport avec les facteurs impliqués dans le brunissement enzymatiques (anthocyanes, PPO et POD). L'objectif étant de déceler les différences qui pourraient expliquer leur réaction aux différents traitements envisagés.

IV.2.1. Les anthocyanes des coques

Les composés phénoliques constituent un puissant outil pour identifier les différentes variétés dans beaucoup de plantes. Dans le cas du péricarpe de litchi, bien que les flavanols soient largement majoritaires, SPRANGER *et al.* (1998) ont montré que les différences entre variétés résidaient surtout au niveau de la composition en anthocyanes et en flavonols.

L'extrait anthocyanique des deux variétés ont le même spectre chromatographique par CLHP (**Figure 19** : Comparaison du profil chromatographique de l'extrait anthocyanique du péricarpe des deux variétés de litchi)

Conformément à la littérature (LE ROUX, 1999 ; ZHANG *et al.*, 2004), les deux anthocyanes majoritaires (a : 3-rutinoside de cyanidol et b : 3-glucoside de cyanidol) ont été clairement identifiés. Un 3^{ème} pic, qu'on appellera anthocyane c semble avoir une importance non négligeable. Son identification n'a pu être entrepris au cours ce de travail.

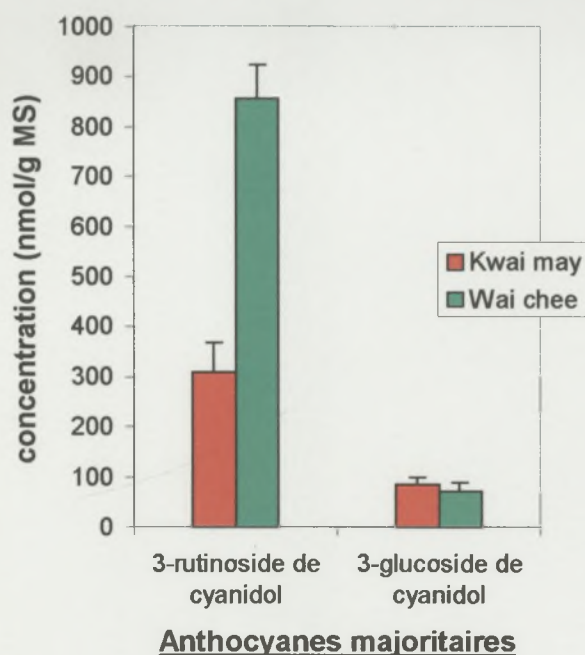


Figure 20 : Comparaison du contenu anthocyanique des coques de deux variétés de litchi

La variété Wai chee est plus riche en anthocyanes que la variété Kwai may (Fig 20). La différence se situe au niveau de la concentration en 3-rutinoside de cyanidol : la variété Kwai may n'en contient que 36% de celle de la variété Wai chee.

Tableau 15 : La composition des anthocyanes de chaque variété

Variétés	Rapport de la concentration en 3-rutinoside de cyanidol sur celle en 3-glucoside de cyanidol	
	Moyenne	Ecart-type
Wai chee	12,3	2,3
Kwai may	3,6	0,1

Les données des études antérieures sont dans l'ordre de grandeur des résultats obtenus ici (Tab 15). En étudiant les anthocyanes de la variété Kwai may, LE ROUX *et al.* (1998) ont dosé 80% de 3-rutinoside de cyanidol et 20% de 3-glucoside de cyanidol, soit un ratio égal à 4. Pour la même variété, MAIRE (2000) a trouvé une proportion égale à 4,1.

Concernant la variété Wai chee, ZHANG *et al.* (2004) a reporté que le 3-rutinoside de cyanidol était l'anthocyane majoritaire de la coque et représentait 97% des anthocyanes totales. Ceci confirmerait la particulière richesse de cette variété en ce composé : la proportion maximale de 3-rutinoside de cyanidol est de 80% dans la variété Kwai may (LE ROUX, 1999) et de 75% (RIVIERA-LOPEZ, 1999) dans la variété Brewster.

Notons que les résultats peuvent varier selon les méthodes utilisées et l'origine des fruits. Par analyse CLHP, LEE et WICKER (1991) trouvent une proportion égale 6,7 pour la variété Brewster de Floride, alors qu'elle est de 4,4 pour RIVIERA-LOPEZ (1999) pour la même variété cultivée au Mexique.

IV.2.2. Les activités enzymatiques oxydantes

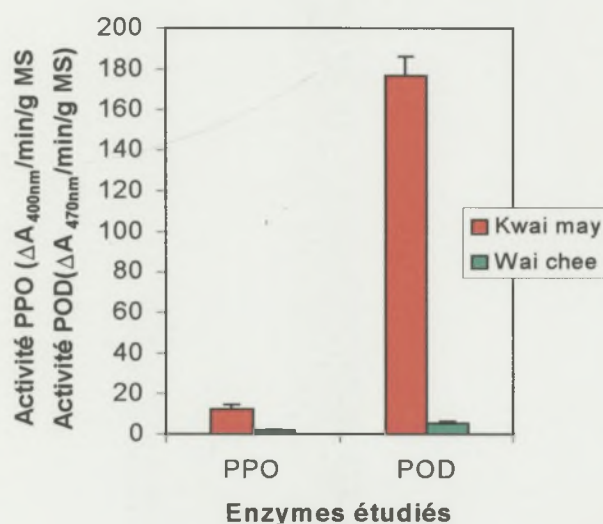


Figure 21 : Comparaison des activités enzymatiques dans le péricarpe de deux variétés de litchi

Les activités enzymatiques sont plus élevées dans la variété Kwai may (Fig 21). L'activité PPO y est 6 fois plus élevée que dans la variété Wai chee, et l'activité POD 30 fois plus. Par ailleurs, l'activité POD est plus grande que l'activité PPO dans les deux variétés. Ces observations tendent à confirmer les résultats obtenus par ZAUBERMAN *et al.* (1991), ZHANG *et al.* (1997).

Tableau 16 : Comparaison de l'activité PPO et POD dans la coque de litchi

Variétés	R = Rapport activité POD / activité PPO		Auteurs
	Résultats obtenus	Littérature	
Kwai may	14,1	30	ZAUBERMAN <i>et al.</i> , 1991
Wai chee	2,2	7,2	ZHANG <i>et al.</i> , 1997

Les résultats obtenus sont faibles par rapport aux données des auteurs cités. Ceci s'explique sûrement par le fait que ZAUBERMAN *et al.* (1991) et ZHANG *et al.* (1997) ont utilisé le 4-méthyl catéchol comme substrat pour le dosage de la PPO, alors que nous avons travaillé avec le catéchol qui a plus d'affinité avec la PPO de la coque de litchi.

La variété Wai chee et Kwai may ont des caractéristiques très différentes, aux vues des paramètres étudiés ici.

IV.3. INFLUENCE DES TECHNIQUES DE CONSERVATION SUR DIFFERENTS FACTEURS

L'objectif de cette partie est d'étudier le mode d'action de deux traitements sur les facteurs impliqués dans le brunissement enzymatique .

IV.3.1. Etude du mode d'action du traitement de trempage

IV.3.1.1. Evolution des anthocyanes du péricarpe

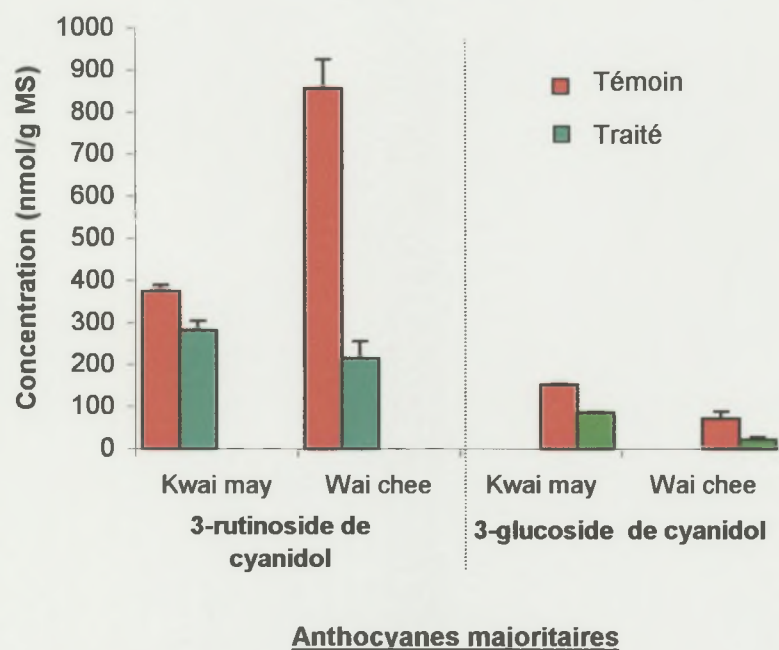


Figure 22 : Effet du traitement de trempage sur le contenu anthocyanique

Le traitement acide conduit à une perte d'anthocyanes dans les deux variétés (Fig 22). Il est cependant à remarquer que la variété Wai chee en perd plus : 75% du 3-rutinoside de cyanidol et 70% de 3-glucoside de cyanidol contre respectivement 25% et 45% pour la variété Kwai may.

IV.3.1.2. Evolution des activités PPO et POD

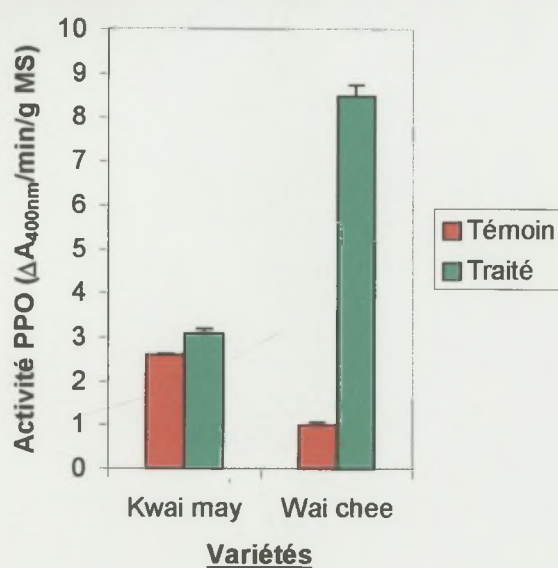


Figure 23 : Influence du traitement de trempage sur l'activité PPO

L'activité PPO des deux variétés évolue de façon différente après le trempage (Fig 23). Dans la variété Wai chee, elle augmente de plus de 8 fois alors que dans la variété Kwai may, la variation est faible (< 15%)

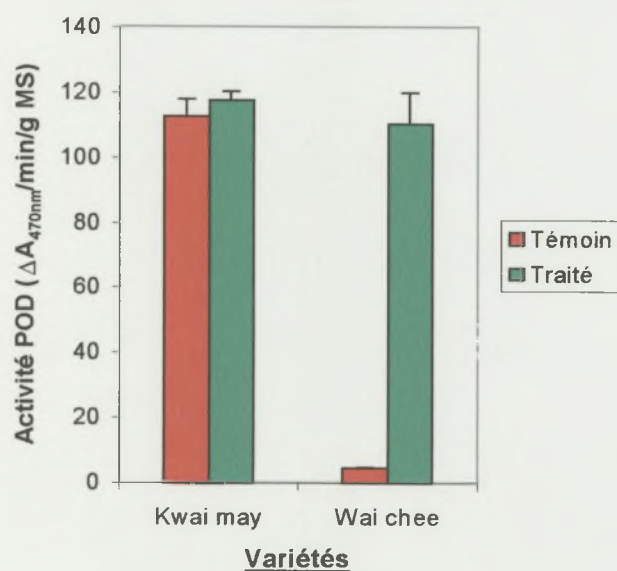


Figure 24 : Influence du traitement de trempage sur l'activité POD

Dans la variété Wai chee, l'activité POD est 20 fois plus importante après trempage alors que son évolution n'est pas significative dans la variété Kwai may (Fig 24).

Les deux variétés répondent différemment au trempage dans l'acide citrique et chitosane.

La variété Kwai may se prêterait mieux à ce type de traitement. Effectivement, il est noté une stabilisation des activités enzymatiques oxydantes (PPO et POD) qui réduirait les pertes en anthocyanes. Ceci confirme les observations de ZHANG et QUANTICK (1997) qui ont montré que le trempage dans du chitosane retardait la diminution du contenu anthocyanique et l'augmentation de l'activité PPO ; et il inhibait partiellement l'augmentation de l'activité POD. L'effet du chitosane est ici renforcé par l'acide citrique qui présente des effets inhibiteurs sur des enzymes oxydantes telles que la PPO (JIANG *et al.*, 1999 ; JIANG *et al.*, 2004b).

Pour la variété Wai chee, les pertes en anthocyanes sont particulièrement importantes et coïncident bien avec une augmentation des activités PPO et POD. Ceci confirmerait le rôle des réactions enzymatiques dans la perte de coloration (LIN *et al.*, 1988 ; HOLCROFT et MITCHAM, 1996 ; JIANG, 2000).

Cette différence de réaction des deux variétés pourrait s'expliquer par la résistance des membranes cellulaires à l'acide. Le traitement avec HCl à forte concentration ou pour une durée excessive peut endommager le péricarpe de litchi (JIANG *et al.*, 1997a). L'accélération du brunissement après un trempage dans de l'acide pourrait être du à la destruction de la compartimentation enzymes-substrats, conduisant à un renforcement des activités enzymatiques (JIANG *et al.*, 2004c).

La variété Kwai may aurait des membranes cellulaires plus résistantes à l'acide que la variété Wai chee. Par rapport à la variété O-Hia, la variété Kwai may est plus adaptée à un traitement au H₂SO₄ avant une conservation à 5,5°C (KETSA et LEELAWATANA, 1992) et sa durée de conservation est plus longue.

Malgré la stabilité des activités enzymatiques PPO et POD, la variété Kwai may reste sujette à des pertes en anthocyanes. En accord avec ZHANG *et al.* (2001) et ZHANG *et al.* (2004b), la dégradation des anthocyanes ne serait pas uniquement liée à des activités enzymatiques oxydantes

IV.3.1.3. Activité anthocyanase

Il a été montré que les anthocyanes de la variété Wai chee sont plus sujets à la dégradation que ceux de la variété Kwai may. ZHANG *et al.* (2001) ont mis en évidence la présence d'activité anthocyanase dans la coque de litchi qui pourrait expliquer cette différence.

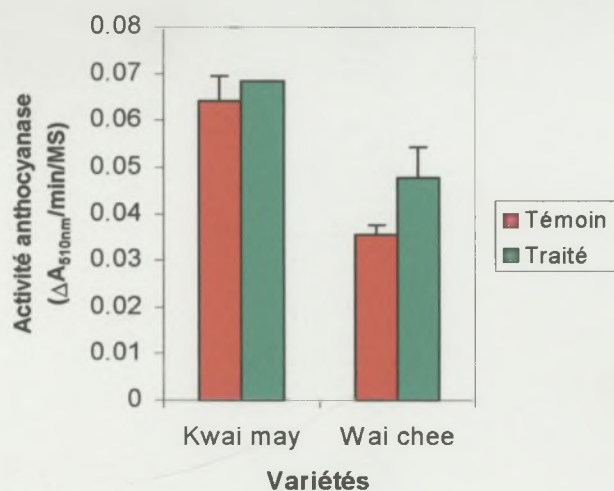


Figure 25 : Evolution de l'activité anthocyanase

Dans les échantillons non traités, l'activité anthocyanase est plus élevée (2 fois) dans la variété Kwai may (Fig 25). Après le traitement de trempage, la variation n'est pas significative dans cette variété, alors que l'activité anthocyanase augmente de 35% dans la variété Wai chee.

Cette augmentation de l'activité anthocyanase entraînerait la production d'anthocyanidines qui sont plus labiles (dégradation spontanée), et constituent de bons substrats pour la PPO et la POD. (ZHANG *et al.*, 2001)

Dans la variété Wai chee, l'augmentation de l'activité anthocyanase coïncide bien avec l'augmentation des activités PPO et POD, et la forte dégradation en anthocyanes. Cependant, le taux d'augmentation de l'activité hydrolytique est faible par rapport à ceux des activités oxydantes.

IV.3.1.4. Couleur

La couleur rouge est l'indice principal d'efficacité des traitements appliqués au litchi.

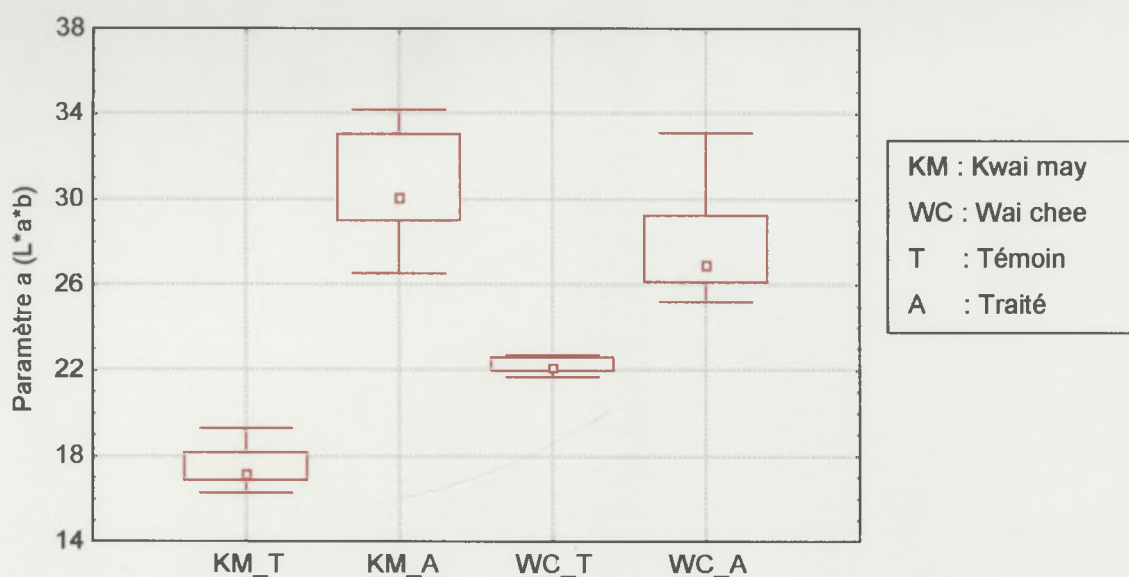


Figure 26 : Effet du traitement de trempage sur la couleur de la coque

Dans les échantillons témoins, l'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration en anthocyanes (Fig 26) : pour le 3-rutinoside de cyanidol, la concentration est de 850 nmol / g de MS pour la variété Wai chee, contre 374 nmol / g de MS pour la variété Kwai may.

Le paramètre « a », indiquant la couleur rouge, est plus grand dans la variété Wai chee. Le même constat pourrait être appliqué en comparant les échantillons traités des 2 variétés.

Après traitement, la variété Kwai may devient plus riche en anthocyanes que la variété Wai chee : 282 nmol de 3-rutinoside de cyanidol / g de MS, contre 210 nmol / g de MS dans la variété Wai chee. Cette corrélation entre le paramètre « a » et la concentration en anthocyanes n'est valable que si les échantillons à comparer se trouvent dans une gamme de pH très proche (Tab 17).

Tableau 17 : Mesure de pH avant et après trempage

Etats des échantillons	Variétés	
	Kwai may	Wai chee
Témoins	4,43	4,48
Traités	3,73	3,42

Effectivement, en comparant les échantillons témoins et traités, on peut confirmer que l'expression de la couleur rouge des anthocyanes dépend du pH (UNDERHILL et CRITCHLEY, 1994 ; UNDERHILL *et al.*, 1992 ; ZHANG *et al.*, 2001). L'intensité de coloration des anthocyanes est directement liée à leur structure qui à pH acide correspond au maximum d'absorption du cation flavynium. (LE ROUX, 1999 ; PERRET, 2001). Ainsi, bien que les coques des deux variétés

perdent des anthocyanes après traitement, la coloration rouge est plus intense. D'où l'intérêt des traitements acides.

L'observation de la couleur après traitement montre bien que la variété Kwai may se prête mieux au trempage dans une solution de chitosane et acide citrique.

IV.3.2. Mode d'action des atmosphères modifiées

IV.3.2.1. Evolution des anthocyanes du péricarpe

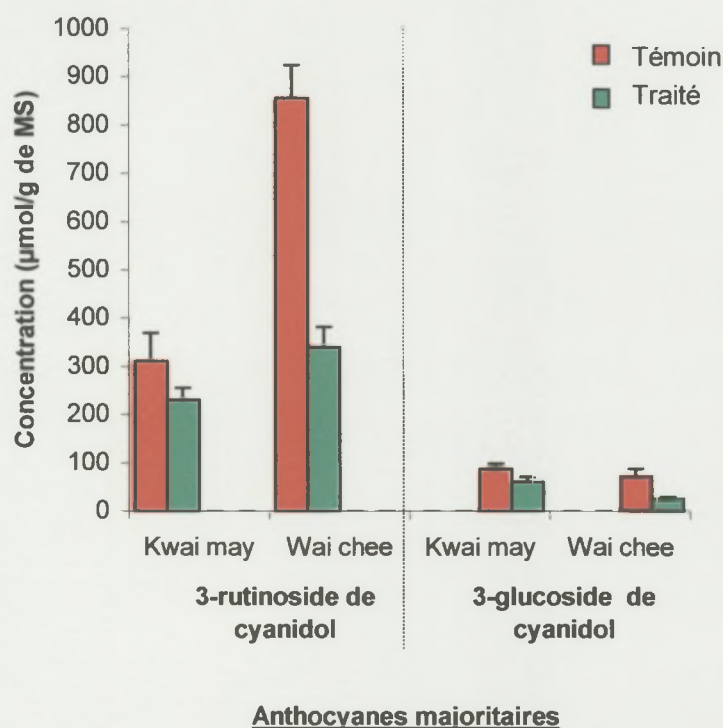


Figure 27 : Effet du filmage sur le contenu anthocyanique

Les deux variétés de litchi perdent des anthocyanes au cours du filmage (Fig 27). Cependant, cette perte reste particulièrement importante dans la variété Wai chee : 60% de 3-rutinoside de cyanidol et 65% de glucoside de cyanidol contre respectivement 27% et 30% dans la variété Kwai may.

Dans la variété Kwai may, l'importance des pertes est équivalente à celles du traitement de trempage.

Ces observations tendraient à confirmer la faible résistance de la membrane cellulaire du péricarpe de la variété Wai chee.

IV.3.2.2. Evolution des activités PPO et POD



Figure 28 : Effet du filmage sur les activités enzymatiques (PPO et POD)

Dans les deux variétés, les activités PPO et POD ne varient pas significativement au cours de la conservation (Fig 28). Ces résultats tendent à confirmer le rôle des atmosphères modifiées qui limitent les pertes en eau donc la dessiccation (PAULL et CHEN, 1987). Ainsi, elles conservent intactes les compartimentations cellulaires et empêchent le contact entre enzymes et substrats.

Malgré cette stabilité des activités enzymatiques, la variété Wai chee reste sujette à des pertes d'anthocyanes non négligeables. Dans cette variété, la dégradation des anthocyanes seraient principalement non enzymatique. ZHANG *et al.* (2001) ont mis en évidence la dégradation spontanée des anthocyanes du péricarpe de litchi. Par ailleurs, SIMPSON *et al.* (1976) ont proposé deux voies possibles de dégradation non enzymatique des anthocyanes :

- l'hydrolyse de la liaison 3-glucosidique pour produire des aglycones plus labiles
- l'ouverture hydrolytique du noyau pyrylium pour former un chalcone substitué.

Ces voies non enzymatiques ont été confirmées par les travaux de ZHANG *et al.* (2001) et ZHANG *et al.*, 2004b.

IV.3.2.3. Couleur

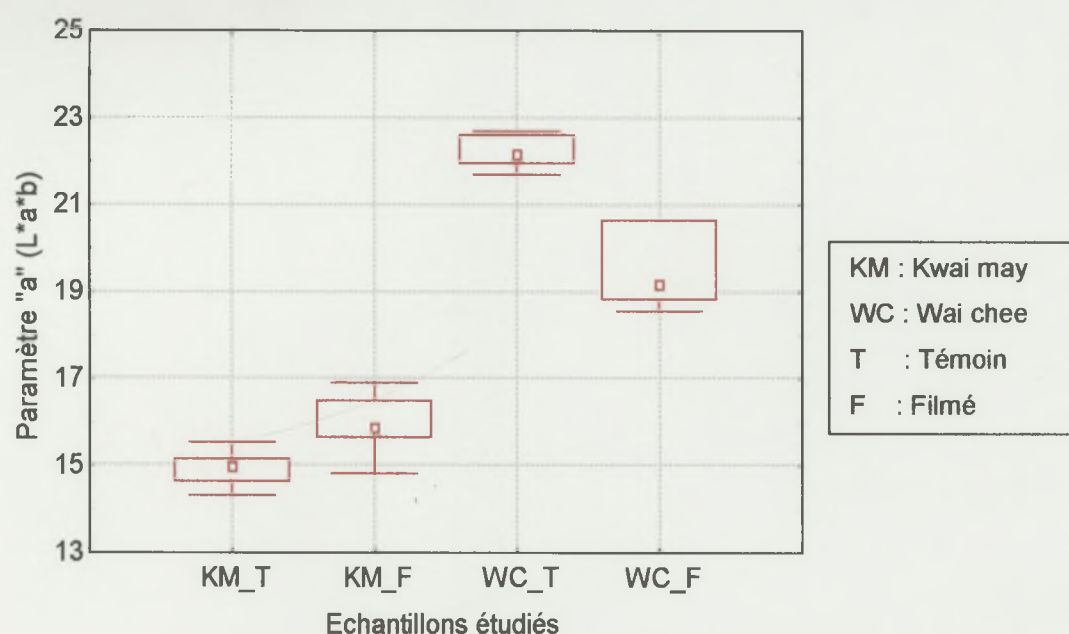


Figure 29 : Effet du filmage sur la couleur de la coque

La perte en anthocyanes se fait ressentir au niveau de la couleur dans la variété Wai Chee (Fig 29). Dans la variété Kwai may, la couleur rouge devient plus intense alors que la concentration en anthocyanes diminue. Ceci pourrait s'expliquer par une légère diminution du pH alors que dans la variété Wai chee, le pH augmente (tab 18).

Tableau 18 : Mesure de pH avant et après filmage

Etats des échantillons	Variétés	
	Kwai may	Wai chee
Témoins	4,63	4,48
Traités	4,55	4,56

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail de recherche présenté visait un double objectif. Dans un premier temps, il s'agissait de contribuer à l'explication du brunissement du péricarpe, principal problème post-récolte du litchi. Ce phénomène serait lié à la dégradation des anthocyanes dont les mécanismes restent mal connus jusqu'à présent. Notre étude était alors focalisée sur les rôles éventuels des activités enzymatiques oxydante (PPO et POD). Dans un deuxième temps, notre recherche portait sur l'étude de mode d'action de deux traitements, en relation avec ces activités enzymatiques.

Ce travail nous a permis d'acquérir des outils efficaces de suivi des facteurs impliqués dans le brunissement enzymatiques : un protocole de dosage de la PPO a été optimisé, et une méthode de dosage de la POD mise au point.

L'étude comparative de deux variétés (Kwai may et Wai chee) a mis en évidence une différence concernant :

- le contenu anthocyanique (concentration totale, composition en anthocyanes majoritaire)
- les activités enzymatiques oxydantes (PPO et POD)
- l'activité anthocyanase

Ces facteurs déterminent la réaction des différentes variétés aux traitements envisagés.

Effectivement, l'efficacité des traitements post-récoltes du litchi (trempage dans du chitosane et acide citrique, utilisation d'atmosphère modifiée) dépend de la destination du produit et de la variété considérée.

La variété Wai chee est plus riche en anthocyanes et les activités PPO et POD y sont faibles. Les anthocyanes de cette variété sont très sensibles aux dégradations qu'elles soient d'origine enzymatique ou non. Aucun des deux traitements ici considérés n'arriveraient à limiter de façon satisfaisante les pertes en anthocyanes. Cependant, l'objectif étant de garder la coloration rouge, même si la concentration en anthocyanes diminue, la couleur persiste grâce au pH acide après trempage.

Dans la variété Kwai may, bien que les activités enzymatiques soient élevées et la concentration en anthocyanes faible, leur dégradation est très limitée au cours des deux traitements. Dans cette variété, le trempage dans la solution de chitosane et acide citrique stabilise les activités enzymatiques, et conserve ainsi les anthocyanes.

Dans les deux variétés, l'utilisation d'atmosphère modifiée remplit pleinement son rôle. En maintenant l'intégrité des membranes cellulaires, elle évite le contact entre enzyme et substrat ; d'où la faible variation des activités PPO et POD

A l'issue de cette étude, on peut confirmer que la dégradation des anthocyanes peuvent être d'origine enzymatique ou non. Et la proportion de ces voies de dégradation dépend de la variété.

Ainsi, il est d'une importance capitale de bien connaître la variété considérée avant d'appliquer un traitement donné. Les facteurs considérés ici (anthocyanes, PPO, POD) sont de bons critères de caractérisation des variétés pour le choix d'un traitement adapté.

L'acquisition de protocoles de dosages enzymatiques efficaces est très importante dans la compréhension et la prévention du phénomène de brunissement. Cependant, leur mise au point nécessite beaucoup de rigueur et de minutie. Des essais préliminaires sont indispensables pour s'assurer de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode.

Au cours de ce travail, on a essayé d'effectuer des optimisations sur des protocoles de dosage de PPO et POD. L'optimisation des différents facteurs retenus a été faite de façon indépendante, pour une première approche. Il n'est cependant pas à exclure que les différents paramètres soient liés, et une optimisation de type plan d'expérience pourrait donner des résultats plus performants.

Concernant la caractérisation de la variété à traiter, nous recommandons de compléter ces critères avec :

- une évaluation des composés phénoliques
- une étude de la résistance des membranes cellulaires

VI. REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

AKAMINE E.K. (1960). Preventing the darkening of fresh lychees prepared for export. *Hawaii Agricultural Experimental Station, University of Hawaii, Technical Programme Report* ; **127**, p 1-17

CHAPMAN K. (1983). Tropical Tree Fruits for Australia. *National Library of Australia Cataloguing-in-Publication Data*, Queensland Department of Primary Industries, Brisbane ; p 179.

CHEN W.X., WU Z.X., JI Z.L. et SU M.X. (2001). Postharvest research and handling of litchi in China - a review. *Acta Hort.* (ISHS) ; **558**, p 321-329.

DONG H., CHENG L., TAN J., ZHENG K. et JIANG Y. (2004). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *J. Food Eng.* ; **64**, p 355-358

FINGER R.L., VIEIRA G. et LEDSHAM L.R. (1997) Maturity standard and pericarp browning of litchi fruit. *R. Bras. Fisiol. Veg.* ; **9** , p 15-18

GHOSH S.P. (2001). World trade in litchi: past, present and future. *Acta Hort.* (ISHS) ; **558**, p 23-30

HARPAZ S., GOLDSCHMIDT E., GIZIS A., VAYA Y. et BEN-ARIE R. (2001). Postharvest treatments of lychee fruit as revealed in fruit surface morphology and enzyme activity. *Acta Hort.* (ISHS) ; **553**, p 313-315

HOLCROFT D.M. et MITCHAM E.J. (1996). Postharvest physiology and handling of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Postharvest Biol. Technol.* ; **9**, p 265-281.

HUANG S., HART H., LEE H.S AND WICKER L. (1990). Enzymatic and color changes during post-harvest storage of lychee fruit. *J. Food Sci.* ; **55**, p 1762 – 1763

JIANG Y-M.(2000). Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. *J. Sci. Food Agric.* ; **80**, p 305 – 310

JIANG Y-M.(2001). Properties of litchi polyphenol oxidase. *Acta Hort.* **558**, ISHS 2001.

JIANG Y-M., DUAN X., JOYCE D., ZHANG Z. et LI J. (2004a). Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chem.*, Consulter avant parution sur le site www.sciencedirect.com

JIANG Y-M. et FU J. (1998a). Effect of postharvest treatment with N6-benzyladenine on quality of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Trop. Sci.* ; **38**, p 161

JIANG Y-M. et FU J. (1998b). Inhibition of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *Food Chem.* ; **62**, p 49-52

JIANG Y-M. et FU J. (1999). Postharvest Browning of litchi fruit by water loss and its prevention by controlled atmosphere storage at high relative humidity. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.* ; **32**, p 278-283.

JIANG Y-M., FU J., ZAUBERMAN G. et FUCHS Y. (1999) Purification of polyphenoloxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *J. Sci. Food Agric.* ; **79**, p 950-954.

JIANG Y-M. et LI Y.B. (2003). Effect of low-temperature acclimation of litchi fruit in relation to shelf life. *J. Hortic. Sci. Biotech* ; **78**, p 437-440.

JIANG Y-M., LI Y. et LI J. (2004b). Browning control, shelf life extension and quality maintenance of frozen litchi fruit by hydrochloric acid. *J. Food Eng.* ; **63**, p 147-151.

JIANG Y-M., LIU S., CHEN F., LI Y. et ZHANG D. (1997a). The control of postharvest browning of litchi fruit by bisulphite and hydrochlorhydric acid. *Trop. Sci.* ; **37**, p 189.

JIANG Y-M., PEN L. et LI J. (2004c). Use of citric acid for shelf life and quality maintenance of fresh-cut Chinese water chestnut. *J. Food Eng.* ; **63**, p 325-382.

JIANG Y-M., ZAUBERMAN G. et FUCHS Y. (1997b). Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biol. Technol.* ; **10**, p. 221 - 228.

JIANG Y-M., ZHU X.R. et LI Y.B. (2001) Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.* ; **34**, p 430-436

KADER F., HALUK J.P., NICOLAS J.P. et METCHE M. (1998). Degradation of cyanidin-3-glucoside by blueberry polyphenol oxidase : kitenic studies and mechanism. *J. Agric. Food Chem.* ; **46**, p 3060-3065.

KETSA S. et LEELAWATANA K. (1992). Effect of pre and poststorage acid dipping on browning of lychee fruits. *Acta Hort.* ; **321**, p 727-731

LE ROUX E. (1999). Etude des composés phénoliques et des systèmes enzymatiques impliqués dans le brunissement du péricarpe de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). Thèse de doctorat en sciences : Chimie organique, Facultés des sciences de Saint Jérôme, Marseille. p 1-203.

LE ROUX E., SARNI-MANCHADO P., LOZANO Y. et CHEYNIER V. Phenolic composition of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and mechanisms of browning. *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2)*, September 1-30, 1998

LEE H.S et WICKER L. (1991). Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigerated storage. *Food Chem.*; **40**, p 263-270.

LICHTER A., DVIR O., ROT I., AKERMAN M., REGEV R., WIESBLUM A., FALLIK E., ZAUBERMAN G. et FUCHS Y. (2000) Hot water brushing : an alternative method to SO₂ fumigation for color retention of litchi fruits. *Postharvest Biol. Technol.* ; **18**, p 235 – 244

LIN Z., LI S., CHANG D., LIN G., LI Y., LIU S. et CHEN M. (1988). The changes of pigments, phenolic content and activities of polyphenoloxidase and phenylalanine amonia-lyase in pericarp of postharvest litchi fruit. *Acta Bot. Sin.* ; **30**, p 40-45

LOEILLET D. (1994). Le marché européen de litchi frais – Une croissance non maîtrisée. *Fruitrop* ; **5**, p 8.

MAIRE T. (2002). Influence de différents traitements chimiques sur l'activité enzymatique et la concentration anthocyanique de la coque du litchi. Thèse de Master of science, ENSIA-SIARC,

Montpellier, 72 p

PANG X.Q., ZHANG Z.Q., DUAN X.W et LI Z.L. (2001). Influence of pH and active oxygen on the stability of anthocyanins from litchi pericarp. *Acta Hort.* ; **558**, p 339-342

PAULL R.E. et CHEN N.J. (1987) Effect of storage temperature and wrapping on quality characteristics of litchi fruit. *Sci. Hort.* ; **33**, p 223-236.

PAULL R., REYES M.-E et REYES M. (1998). Sulfite residues on litchi treated with sulfur dioxide. *Postharvest Biol. Technol.*, **14**, p 229

PEDROT W.E. et MORRIS W.M. (1990). Strawberry polyphenoloxidase : its role in anthocyanin degradation. *J. Food Sci.* ; **55**, p 731-734

PERRET C. (2001) Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Thèse de Doctorat ès Sciences. Facultés des Sciences de l'Université de Neuchâtel. Thèse n°1591.

RIVIERA-LOPEZ J., ORDORICA-FALOMIR C. et WESCHE-EBELING P. (1999). Changes in anthocyanin concentration in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during maturation. *Food Chem.* ; **65**, p 195-200.

SIMPSON K.L., LEE T.C., RODRIGUE J.H. et CHICHESTER, C.O. (1976). Metabolism in senescent and stored tissue. In T.W. Goodwin (Ed.), *Chemistry and biochemistry of plant pigment*, 2nd Edition, Vol. 1. New York: Academic Press, pp. 128 – 155.

SHI J., WANG C., AN X., LI J. et ZHAO M. (2001). Postharvest physiology, storage and transportation of litchi fruits - a review. *Acta Hort.* ; **558**, p 387 – 391

SPRANGER M.I., RICARDO DA SILVA J.M., LEANDRO M.C., CAMEIRA DOS SANTOS P.J., SUN B.S., LE ROUX E. et LOZANO Y. Characterization of litchi (*Litchi chinensis*, Sonn.) cultivars by analysis of the phenolic compounds in the pericarp. *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2)*, September 1-30, 1998

UNDERHILL S., BAGSHAW J., PRASAD A., ZAUBERMAN G., RONEN R. et FUCHS Y. (1992). The control of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) postharvest skin browning using sulphur dioxide and low pH. *Frontier in Tropical Fruit Research, Acta Hort.* ; **321**, p732

UNDERHILL S.J.R., COATES L.M. et SAKS Y.. (1997) Litchi. In: Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits. S. Mitra (ed.). *CAB International*, Wallingford, UK, p 191-208.

UNDERHILL S.J.R et CRITCHLEY C. (1993a). Physiological, biochemical and anatomical changes in lychee pericarp during storage. *J. Hort. Sci.*; **68**, p 327-335

UNDERHILL S.J.R et CRITCHLEY C. (1993b). Lychee pericarp browning caused by heat injury. *HortScience* ; **28** : 721-722.

UNDERHILL S.J.R. et CRITCHLEY C. (1994). Anthocyanin decolorisation and its role in lychee pericarp browning. *Aust. J. Exp. Agric.* ; **34**, p. 115.

UNDERHILL S.J.R. et WONG L.S. (1990). A maturity standard for lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Acta Hort.* ; **16**, p 245-251.

ZAUBERMAN G., RONEN R., AKERMAN M., WEKSLER A., ROT I. et FUCHS Y. (1991), Post-harvest retention of the red colour of litchi pericarp. *Sci. Hort.* ; **47**, p. 89 – 97

ZEE F., CHAN JR. H. et YEN C.-R (1998). Tropical and subtropical fruits. *AgSciences*, Inc., Floride ; p 290.

ZHANG D. et QUANTICK C. (1997). Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Postharvest Biol. Technol* ; **12**, p.195.

ZHANG Z., XUEQUN P., JI Z. et JIANG Y.(2001). Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chem.* ; **75**, p 217-221

ZHANG Z., PANG X., XUEWU D., JI Z., JIANG Y. (2004a) Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*. Consulter avant parution sur le site www.sciencedirect.com

ZHANG Z., XUEQUN P., YANG C., JI Z. et JIANG Y.(2004b) Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp. *Food Chemistry* ; **84**, p 601-604.

VII. ANNEXES

Annexe 1 : Le commerce mondial du litchi



➤ Deux marchés principaux : Europe, Asie (Hong-Kong / Singapore)

➤ Modes de transport :

Avion (haut de gamme) : < 1 semaine

Bateau : > 3 semaines

Annexe 2 : Présentation de la structure d'accueil

Ce stage a été effectué au sein du département FLHOR du CIRAD de Montpellier.

1. Le CIRAD

1.1. Historique

A l'origine du CIRAD, Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement, on trouve neuf instituts de recherche tropicale dotés de statuts divers. Ce sont des établissements publics ou de sociétés privées qui sont spécialisées dans différentes filières :

- L'Institut de recherches pour les huiles et oléagineux (Irho)
- L'Institut de recherches sur les fruits et agrumes (Irfa)
- L'Institut de recherches sur le caoutchouc (Irca)
- L'Institut d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux (Iemvt)
- Le Centre technique forestier tropical (Ctft)
- L'Institut de recherches du coton et des textiles exotiques (Irct),
- L'Institut français du café, du cacao et autres plantes stimulantes (Ifcc)
- L'Institut de recherches agronomiques tropicales et des cultures vivrières (Irat)
- Le Centre d'études et d'expérimentation du machinisme agricole tropical (Ceemat)

La fusion de ces instituts en 1984 en un établissement unique, le CIRAD, dote la France d'un outil de recherche pour le développement capable de construire une offre mieux adaptée aux demandes nouvelles qui émergent des pays du sud. Les instituts originels, devenus départements du CIRAD, connaissent quelques modifications selon les politiques structurelles adoptées.

1.2 Mission et stratégie

Le CIRAD est un Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial (EPIC). Sa mission est de contribuer au développement rural des pays tropicaux et subtropicaux par des actions de recherche, des réalisations expérimentales, des actions de formation (France et étranger) ou encore la diffusion d'information scientifique et technique, principalement dans les secteurs agricole, forestier et agroalimentaire. Cette mission est actuellement élargie à la prise en compte des enjeux environnementaux et à la gestion des ressources naturelles qui conduit le CIRAD à participer à l'élaboration de politiques publiques d'aide au développement.

Il est divisé en 7 départements de recherche :

1. CIRAD-tera : Territoires, Environnements et Acteurs
2. CIRAD-forêt : Forêts
3. CIRAD-amis : Amélioration des méthodes pour l'innovation scientifique

4. CIRAD-cp : Cultures Pérennes
5. CIRAD-ca : Cultures Annuelles
6. CIRAD-flhor : Productions Fruitières et Horticoles
7. CIRAD-emvt : Élevage et médecine vétérinaire

Il travaille en coopération avec plus de 90 pays d'Afrique, d'Asie, du Pacifique, d'Amérique Latine et d'Europe. Les différents travaux sont réalisés dans des centres qui lui sont propres, et au sein de structures nationales de recherche agronomique des pays partenaires.

En 2004, le CIRAD emploie 1800 personnes dont la moitié sont des cadres de recherches en métropole ou à l'étranger. Son budget annuel de 152 millions d'euros provient pour 2/3 du Budget Civil de Recherche et de Développement technologique (BCRD) et pour 1/3 de ressources contractuelles. En France, le CIRAD possède un siège social à Paris et un centre de recherche à Montpellier, ainsi que quelques stations dans les DOM-TOM.

La finalité des actions du CIRAD est de faire de la réduction des inégalités, l'un des objectifs prioritaires des rapports internationaux et favoriser une conception équitable de la mondialisation, par le partage et la co-construction des savoirs.

2. Centre de recherche de Montpellier

C'est un centre scientifique international dont les activités appuient les projets de recherche pour le développement conduits sur le terrain. Il compte 1200 agents, et se répartit sur 4 sites : Lavalette, Baillarguet, la Maison de la Technologie et le Parc Scientifique.

Le CIRAD de Montpellier se base sur quatre activités principales.

2.1 La recherche

En interaction avec les projets du terrain, le centre de Montpellier fournit des méthodes scientifiques (analyse des génomes, amélioration des plantes), des techniques (culture in vitro, biologie moléculaire, analyses minérales) et des outils (bases de données, statistiques).

2.2 Les prestations

Au service des chercheurs, des techniciens et des agriculteurs travaillant dans les régions chaudes, des laboratoires de référence identifient les maladies tropicales, préconisent les moyens de lutte adaptés, sélectionnent des variétés végétales, analysent sols, plantes, bois, aliments, caoutchouc et fibres.

Situé hors des zones de production, le centre de Montpellier offre un service de quarantaine pour les transferts à risque de plants et de clones. Il abrite des collections de ressources génétiques et une banque de semences forestières.

2.3 L'expertise

Concentrant un large éventail de compétences, le centre de Montpellier fournit à ses partenaires publics et privés des moyens comme la conception et l'évaluation de projets, diagnostics et recommandations, aide à la décision, appui aux politiques de recherche agronomique nationales et internationales.

2.4 La formation

Plus de 800 chercheurs et techniciens, dont deux cinquièmes viennent des pays du Sud, sont accueillis chaque année pour des formations professionnelles, des stages ou des formations diplômantes.

3. Le CIRAD-FLHOR

Ce département dispose de 10% du budget annuel du CIRAD et compte 300 personnes dont environ 170 chercheurs et techniciens. Il rassemble les compétences de l'établissement dans le domaine des productions fruitières et maraîchères. Ces secteurs de production jouent un rôle très important dans l'économie des départements et territoires d'outre-mer, ce qui explique la forte implantation du département dans ces régions.

3.1 Mission

L'urbanisation rapide des pays du Sud, ses conséquences sur l'approvisionnement alimentaire sécurisé des villes et les exigences nouvelles des consommateurs du Nord, placent les filières fruits, légumes et plantes aromatiques au centre des défis alimentaires de demain. Pour les relever et améliorer la compétitivité de ces filières et de leurs produits, le département, avec le concours de ses partenaires scientifiques et professionnels oriente ses recherches et ses actions d'appui au développement en zones tropicales et méditerranéennes vers l'établissement de systèmes durables de production intégrée, respectueux de l'environnement

3.2 Les champs d'action

- Amélioration génétique : valorisation de la biodiversité, création de variétés, biotechnologies, résistance aux maladies, aux ravageurs et au stress abiotique, qualité des produits

- » Systèmes de production intégrée : écophysiologie et modélisation, protection raisonnée, réduction des nuisances et traitement des déchets
- » Economie de la consommation, des filières, de la production et des marchés, appui aux organisations socio-professionnelles et paysannes
- » Consommation et technologie agroalimentaire : études sur la qualité organoleptique et nutritionnelle, la sûreté alimentaire. Mise au point de procédés innovants pour la préservation de la qualité des produits frais et transformés.
- » Amélioration des opérations post-récolte, des transformations primaires et des produits finis

3.3 Les programmes de recherche

Du département FLHOR dépendent 3 des 28 programmes du CIRAD :

Le programme « ARBORICULTURE FRUITIERE » vise la mise au point des systèmes de production intégrée et favoriser la qualité des produits frais et transformés.

Le programme « BANANIER PLANTAIN ET ANANAS » s'intéresse au maintien de la compétitivité et la durabilité de systèmes de production respectueux de l'environnement, tout en facilitant un développement intégré des filières.

Le programme « PRODUCTIONS MARAICHIERES ET HORTICOLES » a pour objectif de mettre en valeur la place et les rôles de l'agriculture périurbaine dans l'alimentation et les revenus des populations urbaines en Afrique et en Asie.

AUTEUR : Hasina RAMARSON**TITRE** : Etude du mode d'action de quelques traitements sur le maintien de la coloration rouge du péricarpe de litchi

Région : Montpellier, FRANCE**Institution** : CIRAD-FLHOR**Encadrants** : Marie – Noëlle DUCAMP (CIRAD-FLHOR)
Manuel DORNIER (ENSIA-SIARC)**Mots - clés** : Litchi (*Litchi chinensis* Sonn. Cv. Wai chee et Kwai mi), brunissement, conservation, chitosane, acide citrique, atmosphère modifiée, anthocyanes, polyphenoloxydase (PPO), peroxydase (POD)

- RESUME -

Afin de maintenir la couleur rouge du péricarpe de litchi, deux traitements ont été étudiés : le trempage dans une solution d'acide citrique et de chitosane et l'utilisation d'atmosphère modifiée (film plastique). L'influence de ces méthodes de conservation sur le contenu anthocyanique et les activités PPO et POD ont été mesurés sur deux variétés de litchi (Kwai may et Wai chee).

Après récolte, ces deux variétés ont le même spectre anthocyanique en CLHP. Cependant, la variété Wai chee est plus riche en anthocyanes, en particulier en 3-rutinoside de cyanidol ($\times 2,75$). Par ailleurs, les activités enzymatiques sont plus élevées dans la variété Kwai may : PPO ($\times 6$) et POD ($\times 20$).

L'action des traitements ici considérés diffère selon la variété. Après trempage, la variété Wai chee perd une quantité importante d'anthocyanes (75 % de 3-rutinoside de cyanidol contre 25% dans la variété Kwai may). Parallèlement à cela, les activités PPO et POD y augmente de façon spectaculaire (respectivement $\times 8$ et $\times 20$) alors que dans la variété Kwai may, elles varient faiblement ($<15\%$).

Suite à l'application de l'atmosphère modifiée, les activités PPO et POD des deux variétés sont stabilisées. Cependant, la variété Wai chee reste sujette à des pertes importantes en 3-rutinoside de cyanidol (60% contre 27% dans la variété Kwai may).

Côte bibliothèque CNEARC / SIARC :